



UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Adiktologie

Veronika Valachová

**Sociální hra laboratorních potkanů po expozici metamfetaminu  
během kritické periody vývoje**

**Social play of rats after methamphetamine exposure during a  
critical period of development**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: RNDr. Ivana Petříková, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literatury. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 22. 04. 2020.

VERONIKA VALACHOVÁ

.....

Podpis

**Identifikační záznam:**

VALACHOVÁ, Veronika. *Sociální hra laboratorních potkanů po expozici metamfetaminu během kritické periody vývoje*. [Social play of rats after methamphetamine exposure during a critical period of development]. Praha, 2020. 58 s. Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika adiktologie. Vedoucí práce Petříková, Ivana.

## ABSTRAKT

**Východiska:** Zneužívání návykových látek těhotnými ženami je celosvětovým problémem. V České republice je nejvíce zneužívanou látkou během gravidity metamfetamin. Je tomu tak i přesto, že již víme o existenci negativních dopadů na vývoj plodu vzniklých zneužíváním drog těhotnými ženami. Nevíme však přesně, jak je ovlivněn vývoj těchto dětí a k jakým neurobehaviorálním deficitům může dojít.

**Cíle:** Hlavními cíli této preklinické experimentální práce bylo zjistit vliv aplikace metamfetaminu během kritické periody vývoje na sociální hru adolescentních zvířat a definovat pohlavní rozdíly v účinku metamfetaminu na tuto formu chování. Informace budou sloužit k rozvoji znalostí o vlivu expozice drog na vývoj plodu a na celkové chování takto ovlivněných dětí během jejich života.

**Metody:** K provedení experimentální části práce byl využit animální model. Data byla získána pomocí behaviorálních testů vyhodnocovaných programem ODLog. Následovala statistická analýza pomocí rozptylu (ANOVA) a Fisherova *post-hoc* testu. Získaná data byla porovnána ANOVA testem s opakovaným měřením.

**Výsledky:** Metamfetamin ovlivnil sociální hru u obou pohlaví. Hravé i nesociální aktivity byly po expozici metamfetaminem sníženy ve srovnání s kontrolními skupinami, přičemž ve většině případů byli více působením látky ovlivněni samci.

**Závěr a doporučení:** Bylo zjištěno, že metamfetamin aplikovaný ke konci gestace a v období laktace ovlivňuje sociální hru zvířat v průběhu adolescence. Zajímavou skutečností bylo i ovlivnění samotným vpichem, jenž působí jako stresový faktor. Tyto problematiky by bylo vhodné dále zkoumat a zjistit tak komplexnější informace o účincích této látky a její aplikace na vyvíjející se centrální nervovou soustavu.

**Klíčová slova:** metamfetamin – sociální hra – kritická perioda – pohlavní rozdíly

## ABSTRACT

**Background:** Substance abuse by pregnant women is a global problem, the most abused substance during pregnancy in the Czechia is methamphetamine, despite the fact that we are already aware of the negative effects on fetal development due to drug abuse during pregnancy. However, we do not know exactly how these children are affected and what neurobehavioral deficits can occur.

**Aim:** The main objectives of this preclinical experimental work were to determine the effect of methamphetamine application during critical period of development on the social play of adolescent rats and to define gender differences in the effect of methamphetamine on this form behavior. The information will serve to develop knowledge about the impact of drug exposure on fetal development and the overall behavior of children affected in this way during their lives.

**Methods:** We used an animal model to perform the experimental part of the work. Data were obtained using behavioral tests evaluated by ODLog. This was followed by statistical analysis using variance (ANOVA) and Fisher's post-hoc test. Obtained data were compared by ANOVA test with repeated measurement.

**Results:** Methamphetamine influenced social play in both sexes. Social and non-social activities were reduced following methamphetamine exposure compared to control groups, and in the most cases, males were more affected by the drug.

**Conclusion and recommendation:** Methamphetamine applied at the end of gestation and during lactation had affect to the social play behavior of animals. An interesting fact was also the influence of the puncture, which acts as a stress factor. These issues should be further explored to provide more comprehensive information on the effects of this substance and its application to the developing central nervous system.

**Key words:** methamphetamine – social play behavior– critical period – gender differences

### **Poděkování:**

Mé díky patří především paní RNDr. Ivaně Petříkové, Ph.D. za její svědomité a pečlivé vedení této práce. Poskytla mi mnoho cenných rad, připomínek a informací a mimo jiné i podporu během zpracování této práce. Rovněž také děkuji své rodině a blízkým za trpělivost, pochopení a podporu v těchto nelehkých chvílích.

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Psychomotorická stimulancia .....</b>	<b>10</b>
2.1. Obecné účinky psychostimulancií .....	10
<b>3. Metamfetamin .....</b>	<b>11</b>
3.1. Historie metamfetaminu .....	11
3.2. Účinky metamfetaminu .....	12
3.2.1. Pohlavní dimorfismus účinku metamfetaminu .....	13
<b>4. Expozice metamfetaminem během gravidity .....</b>	<b>14</b>
4.1. Prenatální expozice .....	14
4.1.1. Klinické studie.....	14
4.1.2. Experimentální studie.....	15
4.2. Neonatální expozice.....	16
4.2.1. Klinické studie.....	17
4.2.2. Experimentální studie.....	17
<b>5. Ontogeneze nervové soustavy .....</b>	<b>18</b>
5.1. Analogie v neuro-ontogenezi člověka a laboratorního potkana .....	19
5.2. Pohlavní dimorfismus nervové soustavy .....	21
<b>6. Kritické vývojové periody .....</b>	<b>22</b>
6.1. Kritické vývojové periody pro expozici metamfetaminem .....	22
<b>7. Hypotéza .....</b>	<b>24</b>
<b>8. Cíle práce .....</b>	<b>25</b>
<b>9. Materiál a metodika.....</b>	<b>26</b>
9.1. Chov laboratorních zvířat .....	26
9.2. Fertilizace .....	26
9.3. Prenatální a postnatální péče .....	26
9.4. Behaviorální test .....	28
9.5. Statistická analýza dat.....	28
<b>10. Výsledky.....</b>	<b>29</b>
10.1. Test sociální hry.....	29
10.1.1. Aktivita spojené s hravým chováním .....	29
10.1.2. Aktivita spojené se sociálním zkoumáním.....	34

10.1.3. Nesociální aktivity.....	36
<b>11. Diskuse .....</b>	<b>40</b>
<b>12. Závěr .....</b>	<b>44</b>
<b>13. Seznam použité literatury .....</b>	<b>45</b>
<b>14. Seznam zkratk .....</b>	<b>56</b>
<b>15. Seznam tabulek .....</b>	<b>57</b>
<b>16. Seznam obrázků .....</b>	<b>58</b>



# 1. Úvod

Velmi závažným celosvětovým problémem je zneužívání drog těhotnými ženami. V České republice je nejvíce oblíbenou tvrdou drogou těhotných drogově závislých žen metamfetamin. Matky užíváním této psychostimulační drogy vystavují riziku nejenom sebe, ale protože metamfetamin snadno prostupuje všemi bariérami v těle matky i vyvíjejícího se plodu, nepřímo ohrožují také vývoj svého potomka. Díky lipofilním vlastnostem a malé molekule se snadno koncentruje i v mateřském mléce, tím pádem matka exponuje svoje dítě i během laktace. Z preklinických studií je známo, že prenatální a časná postnatální expozice metamfetaminu zasahuje do maturace centrální nervové soustavy plodu, která probíhá od druhé poloviny gravidity až do odstavu. Proto časná expozice během prvních pár dní vývoje nemusí negativně ovlivnit vývoj mozku plodu, na rozdíl od pozdějších vývojových stadií, které mohou být naopak mnohem citlivější na negativní účinek této drogy. Bylo prokázáno, že pozdější expozice narušuje dráhy signální transdukce, syntézu proteinů, a i samotnou DNA. Tyto účinky vedou k dlouhodobým neurobehaviorálním deficitům, které se mohou projevit později v životě. Expozice metamfetaminu ovlivňuje také mezipohlavní rozdíly v neuroanatomii a funkci mozku, které se nejvíce formují v periodě od gestačního dne 18 do postnatálního dne 10 u laboratorních potkanů. Navíc se zdá, že období adolescence je také jednou z kritických period pro odhalení kognitivních deficitů potomků matek, které během gravidity drogy užívaly.

## 2. Psychomotorická stimulancia

Psychostimulancia jsou látky, jež stimulují centrální nervovou soustavu (CNS). Jedná se o vysoce návykové látky, které mají 2-amino-fenylpropanové uspořádání. Do této skupiny patří přírodní látky – alkaloidy a synteticky připravované látky – deriváty odvozené od amfetaminu či extáze (Doležal et al., 2013). Účinky těchto látek jsou vázány na zvýšení hladiny biogenních aminů, mezi které patří noradrenalin, dopamin a serotonin. Ke zvyšování koncentrací dochází na synapsích CNS. Tímto mechanismem vzniká zvýšení přenosu signálu na postsynaptický neuron (Kalina et al., 2015).

Mezi hlavní zneužívané látky této skupiny patří budivé aminy, jejich nejznámější zástupci jsou metamfetamin (MA), extáze (MDMA), amfetamin a poté i kokain, patří sem i některá farmaka, která se indikují při poruchách pozornosti u dětí a dospělých a také při narkolepsii (Kalina et al., 2015).

Mezi hlavní stimulancia v České republice patří především MA, který je znám také jako pervitin, piko, perník. Ve světě se používá označení speed, meth, crystal meth, crank, ice. V Česku oproti ostatním evropským zemím dominuje především právě MA, jinde v Evropě dominuje spíše amfetamin, ale celosvětově i přesto nese prvenství MA (Kalina et al., 2015).

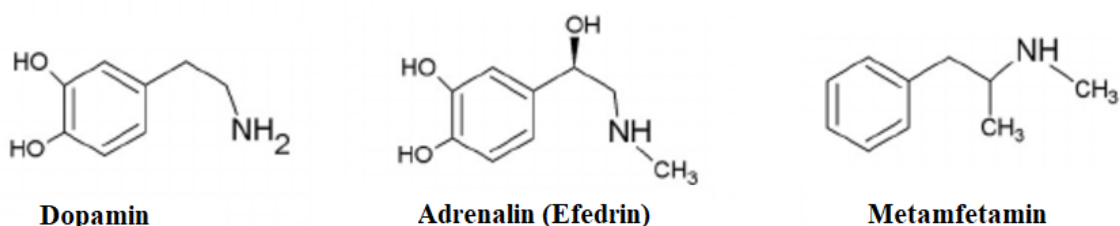
### 2.1. Obecné účinky psychostimulancií

Psychostimulancia působí na organismus povzbudivě, zvyšují jeho fyzickou i psychickou výkonnost. Mezi obecné účinky této skupiny patří odstranění únavy, snadnější navozování kontaktů, zvýšená komunikativnost a zrychlené myšlení. Aktivuje se jím také osa sympatiku, což navozuje pocit síly a energie. Někdy je pervitin využíván i k redukci hmotnosti, protože navozuje nechutenství a tím i snižuje příjem potravy (Kalina et al., 2015).

Užíváním MA mohou vznikat i nežádoucí účinky, mezi které patří sucho v ústech, pocení a přetížený krevní oběh, což může vyvolávat bolest na hrudi až riziko selhání srdce. Dále také nadměrné vyčerpání organismu a nepříjemné pocity po vyprchání látky. Paranoidní myšlenky o pronásledování a ohrožení, strach a úzkost. Časem mohou vzniknout i halucinace, a to převážně sluchové a také bludy, ty jsou hlavně paranoidně-perzekučního vyznění. Tyto stavy mohou přejít až k toxické psychóze (Kalina et al., 2015).

### 3. Metamfetamin

MA je synteticky vyráběná látka, která se svými účinky na CNS řadí mezi budivé látky neboli stimulancia (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction [EMCDDA] & Europol, 2010). Díky strukturální homologii s katecholaminy je snadno vychytáván axony těchto neurotransmitterových systémů (Obr. 1). MA je klasifikován jako nekatecholaminové sympatomimetikum, to znamená, že má sympatomimetický efekt (McCusker, Bigelow, Vickers-Lahi, Spotts, Garfield & Frost, 1997). Pro jeho výrobu se jako výchozí látka používá efedrin, dále louh a červený fosfor. Velmi čistý MA má krystalickou podobu, ale běžněji se vyskytuje jako mikrokrytalický prášek, jenž nemá zápach, ale disponuje výrazně hořkou chutí (EMCDDA & Europol, 2010; Kalina et al, 2015). MA snadno prostupuje hematoencefalickou bariérou CNS, což je způsobeno jeho lipofilním charakterem (Tomášková, 2017). V CNS dochází působením MA k zvýšení koncentrace mediátorů, konkrétně monoaminů, mezi které patří dopamin, noradrenalin a serotonin. Tento jev probíhá v interneurálních synapsích a v cytosolu nervových buněk.



Obr. 1: Srovnání struktur katecholaminů (dopamin a adrenalin) s metamfetaminem upraveno dle Sanchez-Ramones (2004)

MA je možné aplikovat více způsoby. Jednou z možností je orální aplikace, při které se velmi dobře vstřebává, samotný účinek má nástup do jedné hodiny od užití. Další z možností užití je intravenózní aplikace, kdy účinek nastupuje hned po podání. Spolu s injekční aplikací je také velmi časté nasální užití, tedy šňupání, kdy dochází ke vstřebání pomocí sliznic v nosní dutině. Účinek se tímto způsobem projeví za 5-10 minut po aplikaci. Pokud je MA ve formě hydrochloridu, je možné ho díky jeho těkavosti užívat kouřením, nástup účinku je takto pociťován do jedné hodiny od užití (Senft, 2009).

#### 3.1. Historie metamfetaminu

Poprvé byl MA syntetizován v Japonsku, a to konkrétně z efedrinu v roce 1919. O rok později byl patentován jako lék a na trhu se objevil pod obchodním názvem „Methedrin“. Postupně se začal více využívat i v Evropě. Byl užíván na doporučení lékařů, ale i bez odborného dohledu, a právě tehdy byly pozorovány první vedlejší účinky jako hypertenze, závislost, deprese a jiné duševní potíže. Nicméně byl MA nadále vnímán jako bezpečný a kladně přijímán celou společností. V roce 1938 byl MA zpracován německou

farmaceutickou firmou a na trh uveden pod názvem „Pervitin“. Tento přípravek vešel ve známost především během 2. světové války, kdy byl podáván pilotům německé armády. Na popularitě však získal i mezi civilisty. První větší dostupnost přišla, když armáda prodávala přebytky MA i amfetaminu civilnímu obyvatelstvu (Zábranský, 2007).

Začalo se zavádět omezení pro předepisování těchto látek, ale poptávka přesto zůstala velmi vysoká. Většina MA byla vyráběna farmaceutickými firmami, lékaři předepisovali MA na různá onemocnění. Nejčastěji byli takto indikováni pacienti s depresí, poruchami pozornosti, alkoholismem, obezitou či anorexií. Postupem času se začalo objevovat větší množství ilegálních zdrojů, což byla právě odpověď na postupné snižování předepisování lékaři. Časem byl MA z černého trhu vytlačen ilegálně vyráběným sulfátem amfetaminu (Advisory Council on the Misuse of Drugs [ACMD], 2005; Case, 2005).

Jak uvádí Griffiths, Mravcik, Lopez a Klempova (2008), toto utlačení MA bylo v rámci celé Evropy, jedinou výjimku tvořila Česká republika. Zde již od sedmdesátých let tvoří výroba a užívání MA jeden z nejhlavnějších drogových problémů. Historie MA v ČR má svůj počátek pravděpodobně v roce 1977. V tomto roce byly zjištěny první nálezy MA během prováděných kontrol abusu léčiv. Dá se předpokládat, že to bylo důsledkem snadné dostupnosti legálního efedrinu, z něž byl MA vyráběn redukční metodou. I přes následná omezení prodeje efedrinu a ztížení jeho dostupnosti je Česko spolu se Slovenskem i nadále jedním z hlavních producentů MA v Evropě. Mezi syntetickými látkami se řadí na první místo užívání a po konopí je celkově druhou nejužívanější nelegální látkou v ČR (EMCDDA & Europol, 2010). Dle národních odhadů užívá tuto látku v Česku mezi 2,8 až 2,9 případů na 1000 jedinců ve věkovém rozmezí 15–64 let (EMCDDA & Europol, 2010). V roce 2018 bylo v České republice evidováno celkem 12 smrtelných předávkování (Nechanská, 2019).

### 3.2. Účinky metamfetaminu

Jak již bylo řečeno, MA patří mezi *stimulans* CNS. Působí na noradrenergní neurony, které účinkují na  $\alpha$  receptory. Z těchto neuronů uvolňuje noradrenalin (Dubertret, Gorwood, Ades, Feingold, Schwartz & Sokoloff, 1998). Vlivem uvolnění 5-hydroxytryptaminu a dopaminu se zvýší psychomotorická činnost. To se projevuje počátečními pocity bdělosti, tedy potlačením únavy, zbystřením smyslů a celkovým pocitem nárůstu energie. Pokud se aplikují vyšší dávky, dochází až k navození euforie, pocitům blaha a zvýšenému sebevědomí (Kalina et al., 2015). Jeho dalším účinkem je inhibice zpětného vychytávání výše zmiňovaných mediátorů, dále také inhibuje působení monoaminoxidázy, což je enzym štěpící noradrenalin, čímž nepřímě zvyšuje jeho koncentraci (Tomášková, 2017; Mysliveček, Pretl & Hrabovská, 2009; Kalina et al., 2015). Kalina (2003) a Lampert (2015) píší, že se MA velmi dobře distribuuje po celém těle a jeho poločas rozpadu čítá 12 až 34 hodin. Jako ostatní stimulancia zvyšuje činnost srdce, zvyšuje krevní tlak a projevuje se klasický znak v podobě rozšířených zornic (Numachi et al., 2007). K odbourávání dochází

v játrech a to 3 způsoby. Přibližně 45 % se metabolizuje na amfetamin během procesu zvaném N-demetylaci, který je katalyzován enzymem cytochrom P 450 2D6. Další možností je aromatická hydroxylace, při které je také přítomen enzym cytochrom P 450 2D6, kdy vzniká 4-hydroxymetamfetamin. Poslední možností je  $\beta$ -hydroxylace, kdy vzniká noradrenalin. Konečné produkty tohoto metabolismu se poté vyloučí renální exkrecí. Během 24 hodin z těla vyjde přibližně 70 % dané dávky (Cho, Melega, Kuczenski & Segal, 2001). Po odbourání látky z organismu je v těle nedostatek neuromediátorů, což se projevuje jako vyčerpanost. Tento stav je známý jako tzv. „dojezd“ (Kalina et al., 2015). Pokud se MA užívá dlouhodobě, dochází k ireverzibilním změnám metabolismu na mitochondriální úrovni, může dokonce dojít až k apoptóze neuronů (Tomášková, 2017). Mezi citelné projevy dlouhodobého užívání MA patří navýšení nervozity a neklidu, poruchy spánku, ovlivnění sexuálního života a nechutenství vedoucí ke snížení tělesné hmotnosti, také se může objevit i skřípání zubů (Yui & Miura, 1996).

Během vývoje ovlivňuje MA CNS a výsledné chování prostřednictvím působení na transportéry a receptory monoaminů v určitých oblastech mozku (Kish et al., 2008; Rothman et al., 2001). Odpovědnost za danou reakci na užití drogy a za vznik samotné drogové závislosti mají struktury prostupující meso-limbickou dopaminovou dráhou (bazální ganglia, *nucleus accumbens* a dorsolaterální a dorsomediální striatum) (Belin & Everitt, 2008). Další struktury patřící do neurálního okruhu dopaminové dráhy (amygdala, mediální prefrontální kůra a ventrální tegmentální oblast) ovlivňují i sociální chování a vytváření paměťových stop (Rice & Barone, 2000). MA vyvolává v těchto oblastech zvýšený výskyt dopaminu, což způsobí vyšší produkci volných kyslíkatých radikálů, to vede k poškození mitochondrií a následnému zániku monoaminových nervových zakončení (Jablonski, Graham, Vorhees & Williams, 2015; Jablonski, Williams & Vorhees, 2016; Ricaurte, Seiden & Schuster, 1984).

### **3.2.1. Pohlavní dimorfismus účinku metamfetaminu**

Důležitý faktor, ovlivňující účinky MA, je hladina pohlavních hormonů. U žen dochází k pomalejší degradaci a eliminaci drogy než u mužů, může za to nižší aktivita degradačního enzymu, cytochromu P 450, právě u žen (Kato & Yamazoe, 1992; Roth & Carroll, 2004). Dalším aspektem podporující citlivost žen na účinek MA je jejich tělesná konstituce (Kučerová et al., 2015). V zásadě disponují nižší tělesnou hmotností a mají jiný poměr tukové a svalové hmoty. Tyto rozdíly vedou k vyšší koncentraci drogy v plazmě i mozku žen oproti mužům při podání stejného množství látky (Rambousek, Kačer, Syslová, Bumba, Bubeníková-Valešová & Šlamberová, 2014; Kučerová et al., 2009). Dále bylo prokázáno, že senzitivitu na drogu zvyšují pohlavní hormony, v tomto případě estrogen. Ženy jsou navíc ovlivňovány fází reprodukčního cyklu, ve které se aktuálně nachází (Kato & Yamazoe, 1992; Roth & Carroll, 2004). Studie White et al. (2002), ve které sledoval působení reprodukčního cyklu ženy na účinek MA, bylo zjištěno, že droga má silnější účinek

během folikulární fáze oproti fázi luteální. Citlivost byla pozitivně ovlivněna hladinou estradiolu. Je prokázáno, že u žen je vznik závislosti rychlejší než u mužů. Na druhou stranu mají rychlejší reakci na léčbu a probíhají u nich méně relapsy v době abstinence.

## **4. Expozice metamfetaminem během gravidity**

Užívání drog během těhotenství se stává celosvětovým problémem (Marwick, 2000). MA odblokovává sexuální zábrany a zvyšuje prožitek z pohlavního styku. Stimulující účinky drogy navíc podporují riziko nechráněného styku, vzniklá závislost mnohdy vede k prostituci za účelem zisku drogy nebo peněz na její koupi. Během dlouhodobého užívání MA dochází ke změnám menstruačního cyklu nebo k jeho úplné ztrátě, proto může dojít k pozdnímu zaznamenání těhotenství. Tyto aspekty mohou poté vést k neplánovanému otěhotnění (Zapata Hillis, Marchbanks, Curtis & Lowry, 2008; Steinberg, Grella, Boudov, Kerndt & Kadrnka, 2011; Kocherlakota, 2014). Důvody užívání drogy těhotnými ženami jsou různé buď rozvinutá závislost nebo se často jedná i o snahu udržet si tělesnou hmotnost, MA má totiž anorektické účinky. MA je oblíbený i díky jeho stimulačním účinkům, kdy gravidním ženám dodává energii (Marwick, 2000; Williams, Blankenmeyer, Schaefer, Brown, Gudelsky & Vorhees, 2003a; Williams, Moran & Vorhees, 2003b). Již víme, že prenatální i neonatální expozice MA u plodu ovlivňují vývoj jeho mozku. Dochází k tomu vlivem narušení dráhy signální transdukce a syntézy proteinů a až samotné DNA. To může vést k neurobehaviorálním deficitům, které se ale mohou projevit až v pozdějším období života (Jablonski et al., 2015; Jablonski et al., 2016; Ricaurte et al., 1984).

### **4.1. Prenatální expozice**

Je známo, že 84,3 % těhotných uživatelék užívá MA během prvního trimestru. V druhém trimestru se jedná o 56,0 % závislých těhotných a v třetím trimestru s užíváním pokračuje stále 42,3 % (Della Grotta et al., 2010). Vzhledem k tomu, že MA je lipofilního charakteru, velmi rychle se z krve vstřebává do mozku matky a snadno prochází i placentární bariérou přímo do plodu, ovlivňuje tedy jeho prenatální vývoj (Robinson & Becker 1986). Koncentrace drogy u plodu se udává jako 50 % koncentrace drogy, která cirkuluje v krevním oběhu matky. Plod je však schopen játry odbourávat menší množství látek než matka, proto je možné, že se v jeho těle bude vyskytovat i vyšší koncentrace než v těle matky (Dattel, 1990). Stupeň ovlivnění plodu se odvíjí podle načasování expozice během různých stadií gestace (Della Grotta et al., 2010).

#### **4.1.1. Klinické studie**

Pomocí neinvazivního vyšetření ultrasonografie se prokázal negativní vliv MA na plod během vývoje v těle matky (Konkol, 1994; Konkol, Murphey, Ferriero, Dempsey, Olsen, 1994; Tronick & Beeghly, 1999). Vznikají různé malformace a defekty, do kterých patří například rozštěpy rtů, vady srdce, nízká porodní váha, malý obvod hlavy a jiné růstové

retardace. MA svými vazoaktivními vlastnostmi ovlivňuje zásobení plodu živinami, navíc se zde ještě může přičítat anorektický účinek, jenž způsobuje potlačení chuti k jídlu (Wouldes, LaGasse, Sheridan & Lester, 2004). Také byly patrné morfologické i funkční změny různých struktur v CNS (Dixon & Oro 1987). Ve studii Changa a kol. (2004) je uvedeno, že u dětí vystavených prenatálnímu užívání MA jejich matkami došlo k redukci objemu a celkovému zmenšení těchto struktur: subkortikální struktury, *putamen*, *globus pallidus*, *hipokampus* a *nucleus caudatus*. Toto zmenšení se pravděpodobně projevilo ve zhoršení školních výkonů, objevila se opožděná verbální paměť a neurokognitivní deficity. Chování u těchto dětí se ale změnilo celkově. Novorozenci měli poruchy spánku, byl zvýšen tonus svalů, tremor a byla snížena adaptační schopnost stresu (Wouldes et al., 2004). Veškeré tyto dopady na chování se jeví jako trvalé (Hansen, Struthers & Gospe, 1993). Mimo jiné byly ve švédské studii Cernerud et al. (1996) zjištěny i následné změny během dospívání, kdy chlapci, kteří byli droze vystaveni, byli vyšší a těžší než jejich vrstevníci, u dívek to bylo naopak. Dá se předpokládat, že tento jev nastal v důsledku vlivu MA na nástup dřívější puberty u chlapců. Nicméně tyto účinky nejsou stále jasně prokazatelné. Existují i děti, které navzdory vystavení droze nejeví žádné abnormality.

Péče je snížena i o svou vlastní osobu, kdy se matky dostatečně nehydratují, nepřijímají dostatek živin z potravy, mohou mít zhoršenou hygienu a hrozí i vyšší riziko pohlavně přenosných nemocí, které mohou ohrozit vývoj plodu (Nguyen et al., 2010). Dalším skreslujícím faktorem, jenž výsledně může ovlivnit plod, je to že většina těhotných uživatelék neholduje pouze jedné droze, ale velmi často pijí alkohol a kouří cigarety, kdy obě tyto látky mají také vliv na prenatální vývoj plodu. Přesně z tohoto důvodu je vhodnější testovat mechanismus účinku MA na vývoj plodu na experimentálních zvířatech, u kterých nedochází k ovlivňování vlivem jiných látek (Vavřínková et al., 2001).

#### **4.1.2. Experimentální studie**

V rámci expozice *in utero* je možné MA podávat v určitých časových úsecích prenatálního období nebo v průběhu celé gravidity (Jablonski et al., 2015). Prenatální období vývoje u potkanů 1. až 21. gestačního dni (GD) odpovídá prvnímu a druhému trimestru gravidity u člověka, konkrétně GD 1-9 představuje první trimestr u lidí a GD 10-21 poté druhý trimestr. Jeví se, že vhodnou dávkou MA pro subkutánní aplikaci v experimentálních studiích je 5 mg/kg. Toto množství totiž koreluje s koncentrací látky v plazmě a mozku plodu matek uživatelék návykových látek (Acuff-Smith, George, Lorens & Vorhees, 1996; Rambousek et al., 2014). Když byla během gestace podávána vyšší dávka MA (20,5 mg/kg) nastávaly samovolné potraty, případně i úhyn ještě březích samic (Martin, Martin, Radow & Sigman, 1976). Vlivem koncentrace aplikované látky se zabývala studie Acuff-Smith et al. (1996) kdy bylo zjištěno, že pokud je zvíře prenatálně vystaveno nižším dávkám MA (5, 10 mg/kg/den) v období GD 7-12 a GD 13-18, nedochází k ovlivnění kognitivních funkcí. U

vyšších koncentrací (15, 20 mg/kg/den) v období GD 7-12 už docházelo k poruchám procesu učení a paměti.

Prenatální expozice MA mírně ovlivňuje dlouhodobou koncentraci monoaminů i jejich metabolitů. Tyto změny ale nejsou v mozku komplexní, jednotlivé regiony mozku vykazují specifické odpovědi. Například samčí potomci exponované matky v množství 5 mg/kg MA během celého období gestace vykazovali zvýšenou hladinu dopaminu v *nucleus accumbens* o 288 % (Bubeníková-Valešová et al, 2009). U mláďat byl celkově opožděn časný postnatální somatosenzorický vývoj. Dále byly evidovány zhoršené výsledky u negativní geotaxe, vzpřimovacího reflexu a také byla snížena spontánní motorická aktivita a explorace (Hrubá, Schutová, Šlamberová & Pometlová, 2008; Malinová-Ševčíková, Hřebíčková, Macúchová, Nová, Pometlová & Šlamberová, 2014; Šlamberová, Charousová & Pometlová, 2005). K těmto změnám dohází působením MA na serotoninergní a dopaminergní neurotransmiterový systém, může se jednat pouze o dlouhotrvající, ale i nezvratné behaviorální změny v chování zvířat (Weissman & Caldecott-Hazard, 1995). Tyto behaviorální i neurologické modifikace byly po prenatální expozici MA výraznější až u dospělých zvířat, u mláďat se o tak výrazné změny nejednalo (Vorhees & Pu, 1995).

## 4.2. Neonatální expozice

MA se hromadí v mateřském mléce, čímž může ovlivňovat potomka i postnatálně během kojení (Fox, 1965). Nicméně je důležité podotknout rozdíly v laktanční periodě mezi lidmi a potkany. U člověka toto období probíhá od porodu až do 2,5 roku života, u potkanů je toto období započato porodem a ukončeno odstavením v 21. postnatálním dni (PD). Rozdíly dále vytváří i odlišná doba vývoje mozku. U lidí je nejzásadnější částí pro neuro-ontogenezi období 2. – 3. trimestru, u hlodavců jsou pro vývoj CNS zásadní pozdní prenatální až časná postnatální období, konkrétně období do druhého až třetího týdne po porodu. Pokud tedy chceme podávat MA v kritických periodách, tak u lidí k tomu bude docházet ještě transplacentárně, kdežto u potomků potkanů až během kojení skrze mateřské mléko (Jablonski et al., 2015; Rice & Barone, 2000). Rambousek et al. (2014) zjistili, že pokud matky užívaly MA v období laktace, vyskytovala se tato látka u kojených mláďat v žaludku v požitém mateřském mléce, z toho vyplývá, že tyto ženy disponují MA nejen v mozku a krevní plazmě, ale právě i v mateřském mléce. Pokud byla mláďata nepřímě vystavena MA skrze mateřské mléko během postnatálního období PD 1 až do PD 21 v konkrétní dávce 5 mg/ml/kg, byla prokázána přítomnost MA v jejich krevním séru i mozku. Na základě dalších studií bylo zjištěno, že přenos MA skrze mateřské mléko je možný 24-48 hodin od posledního užití, poté se droga z organismu již vyloučí. Proto je matkám doporučeno kojit až v pozdější době po užití drogy, aby eliminovali možnost expozice svých potomků (Bartu, Dusci & Ilett, 2009; Ilett, Hackett, Kristensen & Kohan, 2007).



Ovlivnění plodu a následně i dítěte není pouze přímým důsledkem drogy. Matky uživatelky nevěnují svým potomkům dostatečnou postnatální péči. Tento jev byl prokázán na animálním modelu, kdy potkaním matkám byla během březosti podávána droga. Tyto matky poté projevovaly snížený zájem o svá mláďata, což se může projevit negativně na vývoji mláďat. U lidských potomků může tato situace vyústit až v psychickou deprivaci a mentální retardaci (Bridges & Grimm, 1982; Fraňková, 1977).

#### **4.2.1. Klinické studie**

Mnoho klinických studií se zabývá negativním vlivem užívání MA v pozdějších stádiích těhotenství na snížené schopnosti matky v péči o potomka (Bartu et al., 2009). Velkým problémem u matek, jež během těhotenství užívaly intravenózně MA, je snížená schopnost nakojit novorozeně. Tato schopnost je zhoršená oproti uživatelkám jiných drog. U MA se jedná o snížení schopnosti až o 76 % a u jiných drog 38 %, což vysvětluje nedostatečný příbytek na váze u novorozenců. V dalších studiích se můžeme setkat s faktem, že u matek užívajících dextroamfetamin *per os* je snížena schopnost sekrece prolaktinu až o 40 % (Cho et al., 2001). U potomků matek užívajících MA během laktace jsou patrné negativní fyzické i behaviorální následky projevující se v pozdějším věku. Může se jednat o hluchotu, mentální postižení, poruchy chování, postnatální růstovou retardaci a poruchy učení a paměti (Cui et al., 2006). Dle dalších studií je možné přisuzovat užívání MA i smrt dítěte během laktace (Bartu et al., 2009; Chomchai, Chomchai & Kitsommart, 2016).

#### **4.2.2. Experimentální studie**

Jako prvotní důsledek užívání MA matkami během laktace se jeví snížení kontaktu a celkového zájmu matky o dítě. Dalším problémem je nižší váhový přírůstek u mláďat exponovaných MA, a dokonce je zaznamenána abnormální tělesná hmotnost i v dalších etapách života (Vorhees et al. 2009). Dle Hrubé Schutové a Šlambrové (2012) byla u mláďat exponovaných MA skrze mateřské mléko v období PD 1-21 snížena lokomoce a ovlivněno i explorační chování. Dále v této studii bylo zjištěno, že dospělá zvířata, která byla neonatálně exponována MA, projevovala zvýšenou anxiету. Vorhees et al. (2009) také ve své studii potvrdil snížení lokomočních aktivit u dospělých jedinců po neonatální expozici MA. Mnohé studie poukazují na důležitost načasování podání MA během postnatálního vývoje mláďat. Právě Vorhees et al. (2009) sledoval ovlivnění kognitivních funkcí dávkou a délkou neonatální expozice MA během vývoje. Zjistil, že pro alocentrické učení, které je vázané na hipokampus, je nejkritičtější období PD 11-20 a kritickou dávku specifikoval na 30 mg/kg aplikovanou dvakrát denně. Když aplikace proběhla v dřívějším období (PD 1-10), nedocházelo k deficitům tohoto typu učení ani paměti (Vorhees, Ahrens, Acuff-Smith, Schilling & Fisher, 1994). Pro egocentrické učení vázané na striatum, je nejrizikovější expozice v období GD 6-15 a PD 11-20. Zde se jednalo o dávku 10-25 mg/kg aplikovanou čtyřikrát během dne (Williams et al., 2003a; Vorhees et al., 2004; Vorhees et al., 2009). Nicméně i nižší dávky o nižším množství, konkrétně 0,625-5 mg/kg aplikované čtyřikrát

denně, ve stejných periodách mohou mít dle Williamse et al. (2004) vliv na poruchy prostorového učení a způsobit deficity v učení a paměti, přičemž tyto poškození mohou přetrvávat až rok po expozici.

K těmto dlouhotrvajícím změnám lokomoční aktivity a kognitivních schopností vlivem neonatální expozice, konkrétně v období od PD 11 do PD 20, dochází vlivem změn v denzitě neurotransmiterových systémů. Dopaminové receptory D1 a D2 jsou redukovány, redukovány jsou i serotoninové a glutamátové receptory, je snížena aktivita proteokináz A a dopaminových metabolitů (Crawford, Williams, Newman, McDougal & Vorhees, 2003; Williams et al., 2003a; Graham et al., 2013).

## 5. Ontogeneze nervové soustavy

Pro vývoj vysoce diferenciovaných struktur jako je CNS je velmi důležitou součástí synchronizace funkčních soustav a jejich vzájemné induktivní působení. Během ontogeneze získávají nervové buňky svou identitu a vytvářejí přesná a uspořádaná synaptická spojení. Jejich morfologie a funkce je ovlivněna nejen genetickými faktory, ale do určité míry je ovlivňuje i vnější prostředí, ve kterém se organismus nachází. Samotný vývoj CNS může být těmito faktory ovlivněn už na samém počátku vzniku buněk. Poznamenány mohou být vzájemné trofické interakce mezi jednotlivými buňkami, mechanismy zajišťující migraci buněk, myelinizace synaptických spojení nebo i růst axonů.

Jako první se u obratlovců během neuro-ontogeneze vytvoří neurální ploténka, z té následně vzniká nervová trubice a nervová lišta. Z nervové trubice dělením prekurzorových buněk posléze vznikají neurony a gliové buňky CNS. Z těchto postmitotických neuronů následně vzniká šedá hmota zralého nervového systému. Z buněk nervové lišty vzniká periferní nervový systém (PNS) (Nicholls, Martin, Wallace & Fuchs, 2013).

Společným znakem vývoje mozku u obratlovců je počáteční nadprodukce neuronů v mnoha oblastech mozku, kterou následně střídá období tzv. buněčné smrti. Buněčná smrt nastává během porodu nebo přechodu od časných postnatálních dní až do dospělosti (Nicholls et al., 2013; Semple, Blomgren, Gimlin, Ferriero & Noble-Haeusslein, 2013).

Vývoj mozku je definován dvěma procesy, a to růstem a zráním. U lidí dochází ke vzniku největšího počtu mozkových buněk před porodem, v tomto období vzniká přibližně  $10^{11}$  neuronů, z čehož většina během prvního trimestru těhotenství. Především na konci těhotenství se dle pohybů plodu dá usuzovat velký rozvoj CNS. U novorozence má mozek pouze 25 % své konečné váhy, ale ihned po narození dochází k progresivnímu vývoji, který je poté ukončen kolem konce druhého roku života. U potkanů je první polovina gravidity zaměřena na embryonální růst. Druhá polovina gestačního a časného neonatálního období zahrnuje organogenezi (Rice & Barone, 2000; Williams et al., 2003a; Ulijaszek, Johnston & Preece, 1998).

## 5.1. Analogie v neuro-ontogenezi člověka a laboratorního potkana

Základem CNS je neurální ploténka, která vzniká z ektodermu už v embryonálním období. U lidí se jedná o přibližně druhý týden gravidity, u potkanů o GD 5-6. Následný vznik neurální trubice, která se vytvoří zvedáním okrajů neurální ploténky až v neurální valy, probíhá u lidí mezi GD 24-28, u potkanů přibližně v polovině gravidity, tedy GD 9-11. Konce neurální trubice se ihned neuzavírají, ale zůstávají otevřené několik dalších dní a vytvářejí tak *neuroporus anterior a posterior*. Během GD 25 u lidí a GD 10,5 u potkanů dochází k uzavření předního neuroporu a tedy později ke vzniku předního mozku. O několik dní později, u člověka GD 27-28 a u potkanů GD 11,5, se uzavírá i zadní neuropor. Když se neurální trubice zcela uzavře, začnou se mitotickým dělením z neuroepitelových buněk vytvářet samotné neurony a gliové buňky. Ty postupnou migrací začnou na povrchu neurální trubice vytvářet šedou hmotu míšni. V pozdějších stádiích vývoje začne myelinizací vznikat bílá hmota míšni (Rice & Barone, 2000; Sadler 2011; Semple et al., 2013).

V CNS dochází k diferenciaci neuronů signály navozenými z okolních struktur. V buňkách ektodermu na nervové trubici dochází k produkci dorzálně orientovaných signálních molekul BMP4. Ty spolu s dalšími signálními molekulami (BMP5, BMP7, Dorsalin, Aktivin) a také s ventrálně orientovanými signálními molekulami SHH z chordy dosralis spustí kaskády růstových faktorů SHH a TGFβ, které mají opačný směr. Pokud dojde ke zvýšení či snížení aktivity těchto protisměrných faktorů, nastane exprese genů, která vyvolá diferenciaci a růst neuronů v oblasti předních míšních rohů. Toto buněčné bujení se u člověka a potkana liší časově, ale strukturálně je podobné. U lidí tento děj probíhá od 4. týdne gestace a u potkanů se jedná o GD 10,5-11 (Tau & Peterson, 2010; Thompson, Levit & Stanwood, 2009). Během 5. týdne gravidity u člověka a přibližně GD 12 u potkanů začínají vznikat základy struktur okolo 3. mozkové komory. Neurogeneze je u potkanů nejvíce zastoupena v období GD 9,5 až do PD 15, konkrétně v kortikální a subkortikální oblasti mozku. U lidí kortikální neurogeneze běží až do věku 2,5 roku (Goulding, Lumsden & Gruss, 1993; Semple et al., 2013).

Nejdůležitější skupina genů odpovídající za regulaci diferenciaci neuronů CNS jsou homeotické geny (Hox geny), které vznikají ve strukturách *chorda dorsalis*, prechordové ploténce a také v neurální ploténce. Hox geny jsou zodpovědné za kódování transkripčních faktorů důležitých pro diferenciaci růstových faktorů a dalších genů. Aby byl zajištěn správný vývoj mozku, je důležitá správně načasovaná odpověď na určité signální molekuly (Semple et al., 2013). Exprese genů pro dané neurotransmiterové systémy je vázána na tkáňové faktory určitých mozkových oblastí, během vývoje může být diferenciaci těchto systému ovlivněna epigenetickými faktory (Le Douarin, 1981).

Mezi hlavní neurotransmitterové systémy, které ovlivňují psychostimulační drogy jsou dopaminergní, serotoninergní a noradrenergní systémy (Herlenius & Lagercrantz, 2004).

Dopaminergní neurony jsou důležité pro motorickou aktivitu a kognitivní funkce. U lidí dochází k jejich vzniku mezi 6. – 8. týdnem těhotenství a u potkanů mezi GD 10-15. Tyto neurony lze nalézt ve ventrální tegmentální oblasti, v hipokampální oblasti, bazálních gangliích a v *substantia nigra* (Herlenius & Lagercrantz, 2004; Olson & Siegel, 1972; Sundstrom et al., 1993). V prefrontálním kortexu tyto buňky ve svém hojném počtu odpovídají za rozhodování, koordinaci pohybů a řešení problémů (Diamond, 1996). Celkem existuje pět typů dopaminergních receptorů (D1 – D5). Nejdůležitější jsou receptory D1 a D2. D1 receptory při stimulaci zapříčiňují vyšší tvorbu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), D2 receptory oproti tomu tvorbu cAMP snižují. D1 receptory dále zvyšují fosforylaci DARPP-32 a podílejí na vzniku paměťové stopy (Goldman-Rakic, 2005).

Buňky serotoninergního systému zodpovídají za složité motorické i smyslové vzory chování. Nacházejí se v epifýze, hypotalamu, ve středním mozku, v *substantia nigra* a v mozковém kmeni. Kromě 5-HT<sub>3</sub> receptoru, který funguje pomocí iontových kanálů s ligandem, jsou ostatní receptory spřažené s G-proteiny. U lidí dochází k vytvoření těchto buněk okolo 5. týdne prenatálního období, u potkanů se jedná o GD 9-11 (Herlenius & Lagercrantz, 2004; Hoyer, Hannon & Martin, 2002).

Noradrenergní systém je lokalizován v mozkovém kmeni, odkud vede 5 hlavních drah inervujících celý mozek. Buňky tohoto systému jsou zásadní pro následný vývoj mozku, odpovídají totiž za regulaci vývoje první vrstvy mozkové kůry. Ta je základem pro další neurogenezi a následnou migraci buněk do ostatních vrstev kortexu. Neurony tohoto typu se u lidí objevují 5. – 6. týden gravidity a u potkanů během GD 12-14 (Herlenius & Lagercrantz, 2004; Sundstrom et al., 1993).

Dále ve vývoji mozku dochází k samotnému dozrávání nervových buněk. Dojde k agregacím buněk, vznikají synaptická spojení, vytvářejí se axony a dendrity, zesilují se spoje mezi jednotlivými synapsemi a celkově nastává zdokonalení přenosu nervového vzruchu. K plnému dozrání synaptických spojení dochází u člověka ve 34. – 36. týdnu těhotenství, u potkanů k úplnému konci prenatálního období, tedy GD 18 až PD 19-21. Samotný vrchol neurogeneze je u lidí odhadován na 40. týden gestace a u potkanů na PD 7-14. (Clancy, Finlay, Darlington & Anand, 2007; Workman, Charvet, Clancy, Darlington & Finlay, 2013; Dobbing & Sands, 1973).

Po porodu dochází u lidí ke zpomalení růstu dalších neuronů, ale do 3. postnatálního týdne se rozvíjí neurotransmitterové systémy prostřednictvím axonů (Gaspar, Cases & Maroteaux, 2003). Dále CNS u lidí dozrává do 1,5 roku, čímž se zdokonaluje. Samotné buněčné dělení poté končí kolem 2. roku života (Greenough, Black & Wallace, 1987). U

potkanů po porodu dojde k rychlému dozrávání astrocytů. Od PD 19-21 dochází ke změnám v morfologii, ke změnám jednotlivých propojení a ke změnám elektrofyzilogických vlastností CNS (Workman et al., 2013; Semple et al., 2013; Clancy et al., 2007).

## 5.2. Pohlavní dimorfismus nervové soustavy

Pohlavní rozdíly jsou patrné především ve velikosti mozku. U mužů je v průměru o 9 % větší než u žen, objem šedé hmoty je ale více zastoupen u ženského pohlaví a objemy mozkových komor nalezneme zpravidla větší u mužů. Ve strukturách se mužský a ženský mozek liší v oblastech thalamu, hypothalamu, amygdaly a *cortex cerebri* (Lenroot & Giedd, 2006; Baron-Cohen, Lutchmaya & Knickmeyer, 2004; Goldstein et al., 2001).

Yamamoto (2007) upozorňuje na rozdíly v Brocově oblasti, *nucleus caudatus* a *stria terminalis*. Giedd a jeho kolegové (1997) uvádí rozdíly v bazálních gangliích spojené se sexuálním dimorfismem. Poté se ještě De Vries a Boyle (1998) zmiňují o rozdílech v corpus callosum, *comissura anterior* a velikosti a tvaru levého *planum temporale*.

Ve vývoji CNS bylo objeveno několik struktur ovlivněných pohlavním dimorfismem. Vývoj CNS se u obou pohlaví liší nejvíce do 20 let, do té doby jsou změny u mužů progresivnější než u žen. U žen dochází k maximálnímu objemu mozkové hmoty v 10,5 až 11,5 letech, u mužů později, konkrétně okolo 14,5 let (Lenroot & Giedd 2006).

Rozdíly v růstu a výsledné velikosti byly pozorovány i v oblastech amygdaly a hipokampu, které spolu se spánkovým lalokem odpovídají za emoce, paměť a řeč. Amygdala má větší objem u mužů, hipokampus je objemnější zase u žen (Lenroot & Giedd 2006; Lenroot et al. 2007). Jak uvádí Becker a kolegové (2008) právě hipokampus roste u žen oproti ostatním částem mozku rychleji než u mužů. Rozdílné dozrávání právě těchto struktur odpovídá vysoké koncentraci androgenních receptorů u amygdaly a obdobně vysoké koncentraci estrogenových receptorů u hipokampu (Lenroot & Giedd 2006).

Za důležitý faktor, který tento pohlavní dimorfismus způsobuje, se považuje především vliv pohlavních hormonů. Ten je nejvíce patrný během nástupu puberty, kdy dochází ke zpomalení doposud progresivního zvětšování objemu šedé hmoty. Důkazem toho je, že maximální objem šedé hmoty je u dívek o 2 roky dříve než u chlapců, což koreluje s dřívějším nástupem puberty u dívek (Schulz & Sisk, 2006; Sisk & Foster, 2004).

V mozcích potkanů jsou cytoplazmatické receptory pro estrogeny a progestiny, které jsou specifické pro jednotlivá pohlaví (McEwen, Davis, Parsons & Pfaff, 1979). Předpokládá se, že rozdíly v počtu receptorů těchto steroidních hormonů v konkrétních oblastech mozku mohou následně zapříčínovat odlišné neuroendokrinní a behaviorální reakce (Goy & McEwen, 1980).

## 6. Kritické vývojové periody

Během vývoje prochází mozek několika citlivými obdobími. Tyto citlivá období jsou známá také jako kritické periody. Označení „kritická vývojová perioda“ je v experimentální psychologii užíváno od roku 1921. Jedná se o dočasné přerušení vývoje během určitých stádií embryogeneze. Tato období trvají určitou, různě dlouhou dobu a pro jednotlivé funkce nastávají v odlišných časových úsecích. Jednotlivé části mozku se vyvíjí v různých období embryogeneze (viz výše) a právě v těchto fázích se jedná o nejcitlivější období, ve kterém může dojít k největším škodám vlivem ohrožujících faktorů. Pro mozek je u lidí velmi citlivé období během nitroděložního vývoje, které se specifikuje na 8.-15. týden gestace. (Stockard, 1920-1921; Ulijaszek, Johnston & Preece, 1998).

Křeček (1973) se ve své studii zabýval tím, jestli je kritická vývojová perioda vázaná na určité věkové období a zda je možné v těchto obdobích navodit vnějšími zásahy vývojové změny nevratného charakteru. Soudil, že tyto změny nemusí mít okamžitý projev, ale že mezi expozicí a následným navazujícím projevem může být delší časová prodleva.

Kritické vývojové periody jsou charakteristické pro tyto tři změny: zvýšená citlivost k vnějším podmínkám, transformace funkčních soustav, změny vztahů mezi jedincem a jeho prostředím. Díky těmto kritériím je možné určit tři poporodní období: kojenecké (u člověka od narození do ukončení kojení, u potkanů od narození do 20.-25. dne života), juvenilní (od ukončení kojení po pohlavní dozrání) a posledním je období dospělosti (od pohlavního dozrání) (Křeček, 1973; King, 1958). Křeček dále píše, že mezi těmito stabilními etapami jsou tři přechodné fáze kritických období: období porodu, období ukončení kojení a období pohlavního dozrávání. První dvě období zahrnují transformace několika funkcí, nastávají anatomické i funkční změny. První období zahrnuje změny na dýchací, trávicí a oběhové soustavě. Druhé období zahrnuje kvalitativní změny obzvláště v trávení, činnosti ledvin a je ovlivněn i endokrinní systém. Endokrinní systém podléhá změnám i během třetího období, období pohlavního dozrávání, konkrétně dochází například ke změnám v činnosti hypofýzy (Křeček, 1973).

### 6.1. Kritické vývojové periody pro expozici metamfetaminem

Experimentální studie na zvířatech zaměřující se na ovlivnění vývoje potomků exponovaných matek ukázaly, že krom samotného užívání látky tyto potomky ovlivňuje i aplikované množství, fáze vývoje plodu v době aplikace a způsob podání. Samotný MA řadíme mezi amfetaminy, které působí na struktury vyvíjející se během druhé poloviny gravidity, takže aplikace MA nejvíce ovlivňuje vývoj mozku v pozdních fázích prenatálního vývoje a časně postnatálně během laktace. U potkanů se jedná o 14. – 15. den gravidity. V těchto fázích embryogeneze metamfetaminy ovlivňují rozvíjející se struktury, mezi které patří zakončení neuronů a samotná maturace mozku (Andersen, 2003; Zheng & Purves,

1995; Williams et al., 2003b). Aplikace v dřívějších stádiích gestace nemusí mít zákonitě negativní efekt na vývoj plodu, jelikož nedochází k rozvoji struktur, které by byly citlivé na působení těchto substancí (Rice & Barone, 2000).

Hřebíčková & Šlamberová (2018) ve své práci stanovily nejkritičtější období pro expozici MA u potkanů na druhou polovinu gravidity (GD 12-22) a prvních 11 dní postnatálního vývoje. Toto období odpovídá u lidí druhé polovině druhého trimestru a třetímu trimestru gravidity u lidí. Tato studie uvádí, že potomci laboratorních krys, kteří byli vystaveni působení MA v tomto období, vykazovali významnější deficity v chování než zvířata, která přišla do styku s drogou během první poloviny gestačního období (GD 1-11), což u lidí odpovídá prvnímu trimestru a první polovině druhého trimestru. Zvířata exponována látce během období GD 12-22 a PD 1-11 vykazovala méně sociálního chování. Dále docházelo ke snížení motorické aktivity a snížené schopnosti učení, což bylo nejvíce znatelné u expozice během PD 1-11. Zvířata exponována během GD 12-22 měla silně ovlivněnou paměť.

## 7. Hypotéza

V rámci práce byl použit model, který se využívá v laboratořích Ústavu fyziologie 3. lékařské fakulty UK. Jedná se o experimentální model pro výzkum drogové závislosti, konkrétně se zaměřuje na ovlivnění morfologického a funkčního vývoje laboratorního potkana vlivem dlouhodobé prenatální a postnatální expozice MA. Již z řady studií je známo, že oba typy expozice MA mají negativní dosah nejenom na těhotnou matku, která drogu užije, ale také nepřímo na vývoj jejího potomka. Mezi možné deficity může patřit ovlivnění sociálního chování u potomků, přičemž obě pohlaví mohou být postižena rozdílně. Určení vlivu užívání drogy na sociální chování může hrát významnou roli v následné péči a výchově těchto dětí.

Aplikace MA byla prováděna v nejcitlivější periodě vývoje mozku pro účinky této drogy, tedy od GD 18 do PD 10, v množství vytvářející koncentraci, která odpovídá koncentraci u plodů drogově závislých matek. Předpokládáme, že u mláďat vystavených účinku MA během gravidity a následné laktace budeme evidovat změny v sociálním chování v porovnání s kontrolními skupinami. Protože mechanismus vývoje mozku vykazuje u obou pohlaví nuance, dále očekáváme, že míra sociální aktivity a nesociálního chování po expozici MA bude rozdílná u samic a samců. K hodnocení vlivu na chování bylo vybráno adolescentní období, ve kterém již přepokládáme přítomnost deficitů v chování zvířat, na základě kterých se dají předvídat i změny u dospělých jedinců.



## 8. Cíle práce

Hlavními cíli mé bakalářské práce je zjistit:

- vliv aplikace MA v kritické periodě vývoje na sociální hru zvířat
- pohlavní rozdíly v účinku MA na sociální hru zvířat

Tato preklinická experimentální práce přispěje k rozvoji znalostí týkajících se vlivu užívání návykových látek na vývoj plodu drogově závislých matek a následné chování těchto dětí v průběhu jejich života.

## 9. Materiál a metodika

### 9.1. Chov laboratorních zvířat

Laboratorní potkani kmene Wistar byli převzati od Charles River Laboratories International, Inc. a dodáni chovnou stanicí Anlab s.r.o. (Praha, Česká republika). Jednalo se o dospělé samce (350-400g) a dospělé samice (250-300g). Zvířata byla roztržena dle pohlaví do plastových klecí (45 cm × 30 cm × 20 cm). Samci čítali 4 kusy na klec a samice 5 kusů na klec. Klece se zvířaty se nacházely v klimatizované místnosti, kde byla nastavena konstantní teplota (24 °C) a standardní světelný cyklus 12 h světlo:12 h tma. Počátek světelné fáze byl v 6:00 h ráno. Po dobu 2 týdnů byla všechna zvířata ponechána v klidu, byl jim zajištěn přístup *ad libitum* ke krmení a vodě.

### 9.2. Fertilizace

Po aklimatizaci jsme samice zvažili a za pomoci vaginálního výplachu provedeného skleněnou pipetou jsme určili, ve které fázi estrálního cyklu (*metestrus*, *diestrus*, *proestrus*, *estrus*) se nachází. Samice, u kterých byla prokázána plodná fáze reprodukčního cyklu (*proestrus*, *estrus*), byly na noc umístěny do klece spolu s pohlavně zralým samcem. Následně byl další den ráno opět proveden vaginální výplach, kdy se na základě přítomnosti spermií dala ověřit fertilizace a byl tak určen první den gestace (gestační den, GD 1). Po fertilizaci byly samice vráceny do původních klecí. Jednotlivé fáze estrálního cyklu byly u oplozených samic sledovány po dobu dalších 5 až 6 dnů, což je přibližná délka jednoho cyklu. Tím byla potvrzena úspěšnost fertilizace a bylo možné tak co nejpresněji určit začátek a i následný průběh gestace.

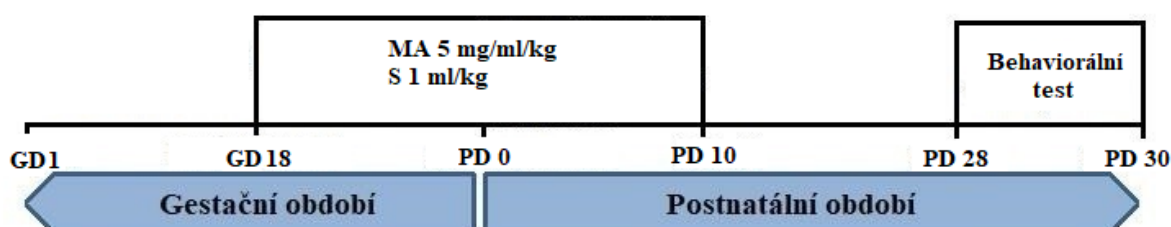
### 9.3. Prenatální a postnatální péče

Gravidním samicím byl aplikován D-metamfetamin HCl, který dodala firma Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). MA byl aplikován subkutánně (*s.c.*) 1-krát denně, a to v periodě od 18. gestačního dne (GD) do 10. postnatálního dne (PD), viz obr. 2. Tato perioda byla vybrána, protože se již ví z preklinických studií, že prenatální a časná postnatální expozice MA zasahuje do maturace CNS plodu, která probíhá od druhé poloviny gravidity až do odstavu (Andersen, 2003; Workman et al., 2013). Proto časná expozice během prvních pár dní vývoje nemusí negativně ovlivnit vývoj mozku plodu, na rozdíl od pozdějších vývojových stadií, které mohou být naopak mnohem citlivější na negativní účinek této drogy, jak ukazují i naše předcházející studie (Hřebíčková & Šlamberová, 2017; Hrubá et al., 2012). Dávka drogy v jedné aplikaci byla 5 mg/ml/kg, ta totiž svou koncentrací v mozku odpovídá koncentracím naměřeným v mozku plodu drogově závislých matek (Acuff-Smith et al., 1996; Rambousek et al., 2014). Toto dávkování je zaužívaným experimentálním modelem na Ústavu fyziologie 3. lékařské fakulty UK pro určení rizik expozice účinkům

MA *in utero* a v rámci postnatální expozice skrze mateřské mléko během kojení (Hřebíčková & Šlamberová, 2017; Ševčíková, Hřebíčková, Macuchová & Šlamberová, 2017).

Kontrolní skupině byl ve stejný čas aplikační periody podáván *s.c.* fyziologický roztok (S) v koncentraci 1 ml/kg. Tímto způsobem byl sledován účinek samotné injekční aplikace, protože se ukázalo, že i samotný vpich může působit jako stresující faktor, který zasáhne do vývoje plodu. Z tohoto důvodu jsme zvolili i absolutní kontrolu, bez aplikace. Samice byly během gravidity váženy a byl sledován jejich hmotnostní přírůstek.

Když samice dosáhly 21. gestačního dne, byly přemístěny po jedné do mateřských klecí. Den porodu byl poté označen jako PD 0.



**Obr. 1: Aplikační perioda během gestace a časně laktace.** GD – gestační den, PD – postnatální den, S – fyziologický roztok, MA – metamfetamin.

V PD 1 byly počty mláďat v hníždě standardizovány dle možnosti na 6 samců a 6 samic.

V PD 21 byla mláďata od matek odstavena. Mláďata jsme rozdělili podle pohlaví do klecí po 4 samcích a 5 samicích. Takto byla zvířata ponechána v klidu do PD 28, tedy do období adolescence, s potravou a vodou v dostupnosti *ad libitum*.

Do každé skupiny bylo zařazeno  $n=8$  párů samců a  $n=8$  párů samic. Celkový počet zvířat byl tedy 48 párů. Toto rozdělení je patrné viz. tab. 1.

**Tab. 1: Počet zvířat zařazených do pokusu.** C – kontrolní skupina, S – skupina exponovaná fyziologickým roztokem, MA – skupina exponovaná metamfetaminem, GD – gestační den, PD – postnatální den.

Expozice (GD 18 – PD 10)		
C (bez aplikace)	S (1 ml/kg)	MA (5 mg/ml/kg)
$n = 8$ párů ♂	$n = 8$ párů ♂	$n = 8$ párů ♂
$n = 8$ párů ♀	$n = 8$ párů ♀	$n = 8$ párů ♀

## 9.4. Behaviorální test

Vliv expozice drogy v prenatalním a časně postnatálním období jsme testovali behaviorálním testem na potomcích ovlivněných matek během PD 28 až PD 30. Pro objasnění mezipohlavních rozdílů v účinku MA byli testováni jak samci, tak samice.

K vyhodnocení byl vybrán test sociální interakce, tedy sociální hra mezi dvěma jedinci. Jedná se o test, kdy je měřena doba, kterou sledovaná jednotka stráví prováděním vybraných sociálních aktivit vůči svému stimulu, který představuje druhé zvíře. Sociální hra je považována za důležitou pro rozvoj sociálních, kognitivních a emocionálních procesů a jejich nervových základů. Sociální hra u mláďat odráží následné chování v dospělém věku (Koob & Zimmer 2012; Poole & Fish 1976).

Sociální hru (Vanderschuren et al., 1997) otestujeme u zvířat mezi PD 28-30 v otevřené aréně ( $45 \times 45 \times 30$  cm) s 2 cm vrstvou podestýlky. Testování bude probíhat v tmavé místnosti, v tmavé fázi světelného režimu. Dva po sobě následující dny (PD 28-29) proběhne individuální habituace testovaných zvířat v testovací aréně po dobu 10 minut, aby si navykla na podmínky prostředí. V den testu sociální hry (PD 30) bude každé zvíře před testováním umístěno do sociální izolace na dobu 3,5 hodin. Testování začne umístěním 2 navzájem neznámých zvířat (zvířata, která byla ustájena během odchovu v různých klecích) do protilehlých rohů arény. Pro testování bude použit pár zvířat se stejnou aplikací, stejného pohlaví a stejné hmotnosti, kteří se neznají. Jejich vzájemné chování bude zaznamenáno pomocí videokamery. Videozáznam bude hodnocen pomocí počítačového programu ODLog. Pozorováno je jedno zvíře, druhé slouží jako stimul pro vyvolání aktivity. Hodnocenými parametry budou: (1) aktivity spojené s hravým chováním: dorzální kontakt, kompletní rotace partnera (poloha na lopatkách), pronásledování partnera; (2) aktivity spojené se sociálním zkoumáním: vzájemné očíhávání v oblasti genitálií; (3) nesociální aktivity: lokomoce, explorace prostředí. U jednotlivých aktivit bude měřena frekvence, tedy kolikrát zvíře danou aktivitu vykoná během daných 15 minut a doba trvání čili čas měřený v sekundách, který zvíře danou aktivitou stráví.

## 9.5. Statistická analýza dat

Při statistickém hodnocení dat jsme nejdříve stanovili rozložení a rozptyl dat v jednotlivých skupinách. Pokud bylo rozložení normální (gaussovské), tj. s rovnoměrnými rozptyly, byla data analyzována pomocí parametrického testu pro více skupin. Použili jsme vyhodnocení pomocí Analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Fisher *post-hoc* testem. Za signifikantní jsme považovali rozdíly pokud  $p < 0,05$ . Protože se aktivita zvířat během 15-minutového testování mění, sledovali jsme nejenom celkovou aktivitu zvířat za tento čas, ale také jsme měřené parametry vyhodnocovali ve třech 5-minutových intervalech. Získané data jsme porovnali ANOVA testem (*Expozice*  $\times$  *Pohlaví*) s opakovaným měřením (*Interval*). Data byla prezentována jako  $[F(N-1, n-N)=xx,xx; p<0,0x]$ , kde F je hodnota

testovaného kritéria,  $N-1$  je stupeň volnosti skupin,  $n-N$  je stupeň volnosti individuálního subjektu a  $p$  je hladina významnosti.

## 10. Výsledky

### 10.1. Test sociální hry

#### 10.1.1. Aktivita spojené s hravým chováním

Statistická analýza ukázala, že expozice MA vedla u samců ke snížení frekvence dorzálního kontaktu [ $F(2,42)=2,970$ ] v porovnání se skupinou C ( $p<0,05$ ) a skupinou S ( $p<0,01$ ) (Obr. 3 B). Navíc se ukázalo, že samci po expozici MA dosahovali méně dorzálního kontaktu v porovnání se samicemi té samé expozice [ $F(2,42)=2,813$ ] ( $p<0,01$ ) (Obr. 3 B). Z výsledků statistické analýzy je dále patrné, že samice strávily více času dorzálním kontaktem v porovnání se samci [ $F(1,42)=4,341$ ; ( $p<0,05$ )] (Obr. 3 A), navíc tuto formu hravého chování vyhledávaly i častěji [ $F(1,42)=4,491$ ] (Obr. 3 B).

U dalšího parametru hravého chování, kompletní rotace partnera, vedla expozice MA k celkovému snížení času stráveného touto aktivitou [ $F(2,42)=1,281$ ] (Obr. 3 C) a snížení početnosti výskytu této aktivity [ $F(2,42)=0,675$ ] (Obr. 1 D) u obou pohlaví. Samice exponované MA věnovaly rotaci partnera méně času než kontrolní skupina samic C ( $p<0,05$ ). U samců došlo ke snížení doby strávené touto aktivitou v porovnání se skupinou C ( $p<0,001$ ) i se skupinou S ( $p<0,01$ ). Statistická analýza hlavních efektů ukázala mezipohlavní rozdíl ve frekvenci kompletní rotace partnera (Obr. 1 D), kde samice vyhledávaly kontakt té druhé méně v porovnání se samci bez ohledu na druh expozice během vývoje [ $F(1,42)=5,557$ ; ( $p<0,05$ )]. Interakci pohlaví a expozice jsme sledovali u samců, kteří po expozici MA rotovali méně než obě kontrolní skupiny [ $F(2,42)=0,675$ ] (Obr. 3 D) {skupina C ( $p<0,001$ ), skupina S ( $p<0,05$ )}. Stejně tak i samice exponované MA vykazovaly snížení frekvence této aktivity [ $F(2,42)=0,675$ ] (Obr. 3 D) s porovnáním se skupinou C ( $p<0,01$ ), nicméně i samice ve skupině S oproti samicím ve skupině C ( $p<0,05$ ).

Z analýzy dat zabývajících se pronásledováním partnera je zřejmé, že samice tento typ hravého chování vykonávaly déle než samci [ $F(1,42)=5,554$ ; ( $p<0,05$ )] (Obr. 3 E). Nejvýraznější je tento rozdíl u kontrolních skupin C [ $F(2,42)=1,739$ ], kdy samci této aktivitě věnovali mnohem méně času než samice ( $p<0,01$ ). Expozice MA vedla u samic k celkovému snížení doby trvání pronásledování [ $F(2,42)=1,739$ ] v porovnání s oběma kontrolními skupinami, se skupinou C ( $p<0,05$ ) i se skupinou S ( $p<0,05$ ) (Obr. 3 E). Na základě statistických výsledků se frekvence tohoto úkonu výrazně nelišila, nejsou zde patrné signifikantní výsledky.

Obrázek 4 A znázorňuje čas věnovaný dorzálnímu kontaktu v jednotlivých 5-minutových úsecích měření. U všech skupin (C, S, MA) obou pohlaví docházelo k určitému nárůstu času stráveného touto aktivitou [F (4,84)=0,233]. Samci skupiny C vykazovali nárůst času věnovaného dorzálnímu kontaktu v porovnání prvního a posledního úseku ( $p<0,05$ ). Dále samci kontrolní skupiny C trávili více času touto aktivitou v rozmezí 10-15 min oproti samcům exponovaným MA ( $p<0,05$ ). U samic kontrolní skupiny C byl zaznamenán delší čas pro danou aktivitu v časovém úseku 10-15 min oproti 0-5 min ( $p<0,001$ ). Samice exponované fyziologickým roztokem (skupina S) vykazovaly více času věnovanému dorzálnímu kontaktu během druhého a třetího úseku (5-10 min, 10-15 min) oproti prvnímu (0-5 min) ( $p<0,01$ ), když se poté u stejné skupiny samic srovnají úseky 5-10 min a 10-15 min je zřejmé, že více času tímto typem chování strávily samice během úseku 10-15 min ( $p<0,01$ ). Samice exponované MA věnovaly delší dobu dorzálnímu kontaktu v intervalu 10-15 min v porovnání s úsekem 0-5 min ( $p<0,001$ ) a 5-10 min ( $p<0,05$ ). V časovém rozmezí 10-15 min můžeme říci, že samci touto aktivitou strávili kratší dobu než samice a to v porovnání skupiny MA ( $p<0,05$ ), tak C ( $p<0,01$ ). Dorzální kontakt vykazoval nárůst frekvence u obou pohlaví ve všech časových úsecích [F (4,84)=0,401] (obr. 4 B). Skupiny C a S u obou pohlaví zaznamenaly nárůst frekvence této aktivity po celou dobu ( $p<0,001$ ). U samců skupiny MA byla frekvence ve všech intervalech nižší než u obou kontrolních skupin C a S ( $p<0,01$ ). Z porovnání samců a samic exponovaných MA je patrné, že tuto aktivitu vykonávali méně samci než samice a to v intervalech 5-10 min ( $p<0,01$ ) a 10-15 min ( $p<0,001$ ).

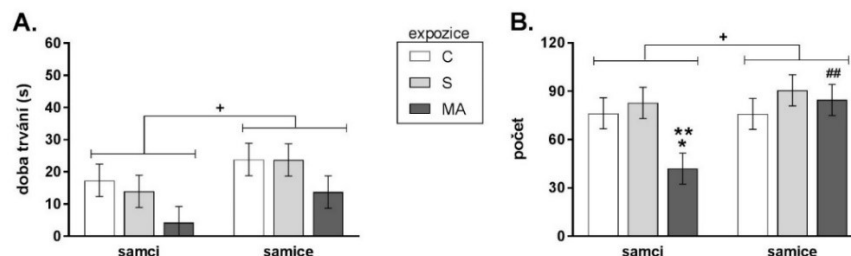
Statistická analýza dat získaných z pozorování celkové rotace partnera odhalila, že expozice MA vedla u samců ke snížení času stráveného touto aktivitou ve všech 5-minutových intervalech oproti kontrolním skupinám (C, S) ( $p<0,001$ ) a u samic v intervalech 5-10 min a 10-15 v porovnání s kontrolní skupinou C ( $p<0,01$ ) [F (4,84)=10,254] (obr. 4 C). Samci i samice skupin C a S vykazovali nárůst doby trvání této aktivity ( $p<0,001$ ). Frekvence rotace partnera se u skupin C a S u obou pohlaví v jednotlivých časových úsecích zvyšovala [F (4,84)=0,644;  $p<0,001$ ] (obr. 4 D). U samců došlo k většímu nárůstu frekvence v intervalech 5-10 min a 10-15 min než v intervalu 0-5 min ( $p<0,01$ ). U samců skupiny MA byla zaznamenána nižší frekvence této aktivity ve všech úsecích měření oproti samcům ve skupinách C a S ( $p<0,001$ ). U samic vedla expozice MA k méně častému vykonávání této aktivity ve srovnání se samicemi skupiny C ( $p<0,001$ ). Samice v kontrolní skupině C rotovaly s partnerem méně často ve všech měřených intervalech oproti samcům stejné skupiny ( $p<0,001$ ).

Z analýzy jednotlivých intervalů je dále zřejmé, že expozice MA ani S neměla vliv na čas strávený pronásledováním partnera u samců. U samic ze skupiny C se čas strávený pronásledováním partnera zvyšoval ve všech časových úsecích [F (4,84)=2,001;  $p<0,001$ ] (obr. 4 E). Samice vlivem expozice MA trávily pronásledováním partnera méně času v intervalech 5-10 min a 10-15 min oproti samicím ve skupinách C i S za stejné časové úseky

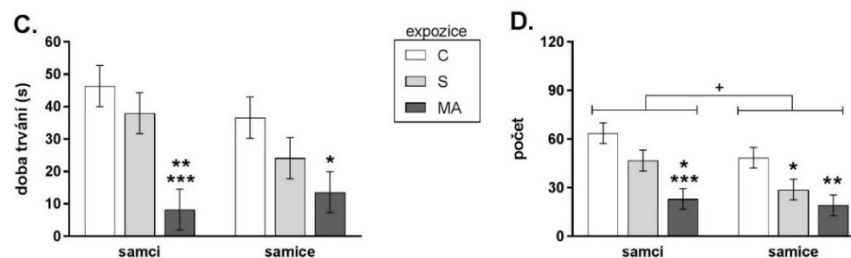
( $p < 0,01$ ). Dále můžeme říci, že samice skupiny C pronásledovaly partnera ve všech intervalech déle než samci stejné skupiny ( $p < 0,001$ ). Na obrázku 4 F je ukázáno, že obě pohlaví ovlivnila expozice MA snížením frekvence pronásledování partnera v intervalu 10-15 min v porovnání se skupinami C i S [ $F(4,84) = 1,706$ ;  $p < 0,05$ ]. U všech skupin (C, S, MA) samců i samic došlo k navýšení frekvence této aktivity v intervalech 5-10 min a 10-15 oproti 0-5 min.

## Celková aktivita během 15 minut

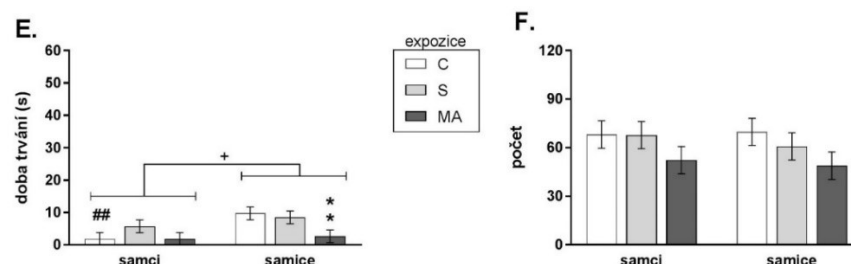
### Dorzální kontakt



### Kompletní rotace partnera



### Pronásledování partnera

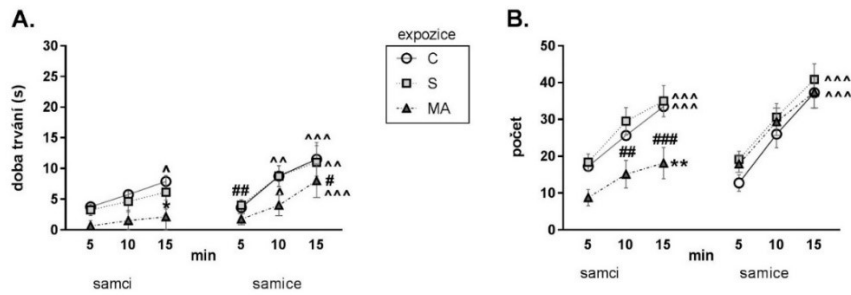


**Obr. 3:** Vliv expozice a pohlaví na aktivity spojené s hravým chováním u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. **A. Dorzální kontakt – doba trvání.** + $p < 0,05$  samice vs. samci. **B. Dorzální kontakt – frekvence.** + $p < 0,05$  samice vs. samci; \* $p < 0,05$  samci C vs. samci MA; \*\* $p < 0,01$  samci S vs. samci MA; ### $p < 0,01$  samci MA vs. samice MA. **C. Kompletní rotace partnera – doba trvání.** \* $p < 0,05$  samice MA vs. samice C; \*\* $p < 0,01$  samci MA vs. samci S; \*\*\* $p < 0,001$  samci MA vs. samci C. **D. Kompletní rotace partnera – frekvence.** + $p < 0,05$  samice vs. samci; \* $p < 0,05$  samci MA vs. samci S; \*\*\* $p < 0,001$  samci MA vs. samci C; \* $p < 0,05$  samice S vs. samice C; \*\* $p < 0,01$  samice MA vs. samice C. **E. Pronásledování partnera – doba trvání.** + $p < 0,05$  samice vs. samci; \* $p < 0,05$  samice MA vs. samice C; \* $p < 0,05$  samice MA vs. samice S; ### $p < 0,01$  samci C vs. samice C. **F. Pronásledování partnera – frekvence.**

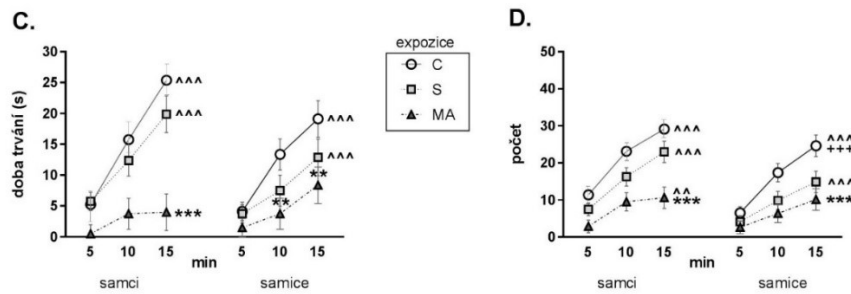


## Aktivita ve třech 5-minutových intervalech

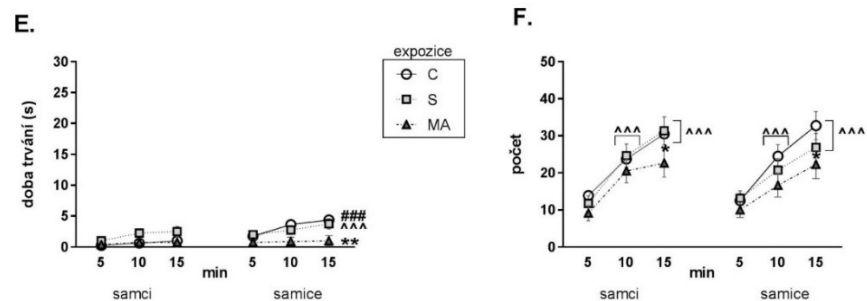
### Dorzální kontakt



### Kompletní rotace partnera



### Pronásledování partnera



**Obr. 4:** Vliv expozice a pohlaví na průběh aktivity spojené s hravým chováním u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. **A. Dorzální kontakt – doba trvání.**  $\wedge p < 0,05$  samci C 0-5 min vs. 10-15 min;  $*p < 0,05$  samci C vs. samci MA 10-15 min;  $\wedge\wedge p < 0,001$  samice C 0-5 min vs. 10-15 min;  $\wedge\wedge p < 0,01$  samice S 0-5 min vs. 5-10 min a 10-15 min;  $\wedge\wedge p < 0,01$  samice C 5-10 min vs. 10-15 min.  $\wedge\wedge\wedge p < 0,001$  samice MA 0-5 min vs. 10-15 min;  $\wedge p < 0,05$  samice MA 5-10 min vs. 10-15 min;  $\#p < 0,05$  samice MA vs. samci MA 10-15 min;  $\#\#\#p < 0,01$  samice C vs. samci C 10-15 min. **B. Dorzální kontakt – frekvence.**  $\wedge\wedge\wedge p < 0,001$  zvýšení frekvence aktivity v čase u samic i samců C a S;  $**p < 0,01$  samci MA vs. samci C a S v čase;  $\#\#\#p < 0,01$  samci MA vs. samice MA 5-10 min;  $\#\#\#\#p < 0,001$  samci MA vs. samice MA 10-15 min. **C. Kompletní rotace partnera – doba trvání.**  $\wedge\wedge\wedge p < 0,001$  zvýšení doby trvání aktivity v čase u samců i samic C a S;  $***p < 0,001$  samci MA vs. samci C a S ve všech intervalech;  $**$  samice MA vs. samice C a S 5-10 min a 10-15 min. **D. Kompletní rotace partnera – frekvence.**  $\wedge\wedge\wedge p < 0,001$  zvýšení frekvence aktivity v čase u samic i samců C a S;  $\wedge$  samci MA 5-10 min vs. 10-15 min;  $***p < 0,001$  samci MA vs. samci C a S;  $+++p < 0,001$  samice C vs. samci C ve všech intervalech;  $***p < 0,001$  samice MA vs.

samice C. **E. Pronásledování partnera – doba trvání.**  $^{***}p<0,001$  zvýšení doby trvání aktivity v čase u samice C;  $^{**}p<0,01$  samice MA vs. samice C a S 5-10 min a 10-15 min;  $^{###}p<0,001$  samice C vs. samci C. **F. Pronásledování partnera – frekvence.**  $^{*}p<0,05$  samci a samice MA vs. samci a samice C a S 10-15 min;  $^{***}p<0,001$  samci a samice C, S, MA 0-5 min vs. 5-10 min;  $^{***}p<0,001$  samci a samice C, S, MA 0-5 min vs. 10-15 min.

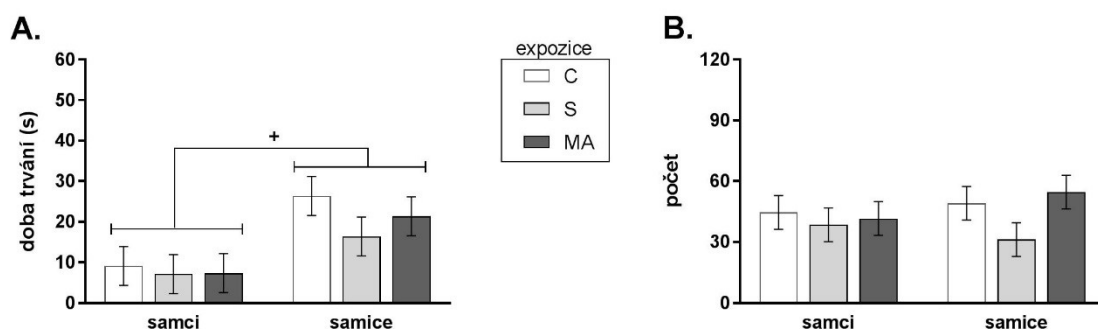
### 10.1.2. Aktivity spojené se sociálním zkoumáním

Expozice MA neměla vliv na sociální zkoumání ani u jednoho z pohlaví. Celková doba trvání (Obr. 5 A) i frekvence (Obr. 5 B) strávené očicháváním v genitální oblasti byly u skupiny MA srovnatelné s oběma kontrolními skupinami C a S. Hlavní efekt pohlaví se ukázal v čase stráveném touto aktivitou, kde samice byly aktivnější v porovnání se samci [F (1,42)=4,168] ( $p<0,05$ ) (Obr. 5 A).

Průběh měření v jednotlivých intervalech byl srovnatelný u všech tří skupin a u obou pohlaví, jak je patrné na obrázku 6 A i B. Během jednotlivých 5-minutových úseků nedošlo k signifikantním výsledkům v trvání ani frekvenci této aktivity.

### Celková aktivita během 15 minut

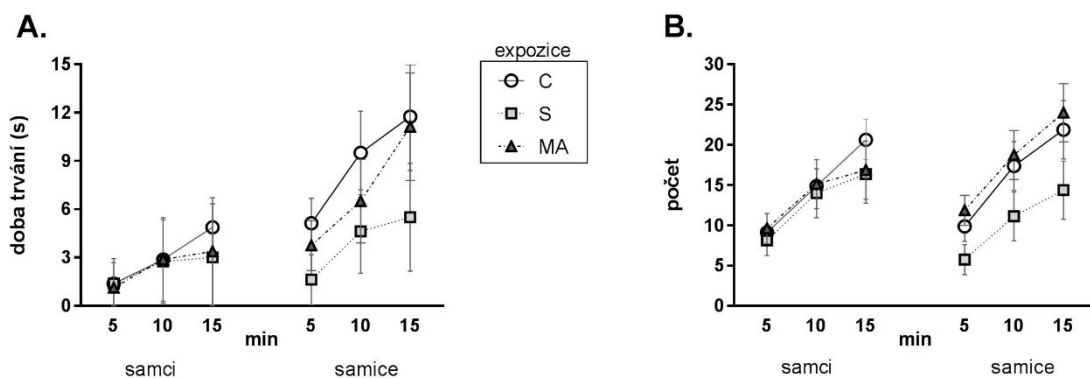
#### Vzájemné očichávání v oblasti genitálií



**Obr. 5:** Vliv expozice a pohlaví na aktivity spojené se sociálním zkoumáním u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. **A.** Vzájemné očichávání v oblasti genitálií – doba trvání.  $^{+}p<0,05$  samice vs. samci. **B.** Vzájemné očichávání v oblasti genitálií – frekvence.

## Aktivita ve třech 5-minutových intervalech

### Vzájemné očíhávání v oblasti genitálií



**Obr. 6:** Vliv expozice a pohlaví na průběh aktivity spojené se sociálním zkoumáním u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. **A.** Vzájemné očíhávání v oblasti genitálií – doba trvání. **B.** Vzájemné očíhávání v oblasti genitálií – frekvence.

### 10.1.3. Nesociální aktivity

Ze statistické analýzy dat vyplývá, že expozice MA a fyziologického roztoku (S) vedla u samců ke snížení času stráveného lokomocí v porovnání s absolutní kontrolou (skupina C) [F (2,42)=2,052] ( $p<0,01$ ) (Obr. 7 A). U frekvence došlo vlivem interakce pohlaví a expozice také k jejímu ovlivnění [F (2,42)=6,958] (Obr. 5 B). Samci ve skupinách C ( $p<0,001$ ) i S ( $p<0,01$ ) vykazovali tuto aktivitu častěji než samci ve skupině MA. U samic se frekvence snížila u skupiny MA oproti skupině S ( $p<0,05$ ). V početnosti výskytu lokomoční aktivity statistická analýza dat odhalila hlavní efekt pohlaví, samice tento typ aktivity vykonávaly častěji než samci, bez ohledu na expozici [F (1,42)=16,931;  $p<0,001$ ] (Obr. 6 B). Ve srovnání obou pohlaví ve skupinách MA je patrné, že samice tento typ aktivity provozovaly častěji než samci [F (2,42)=6,958] ( $p<0,001$ ) (Obr. 7 B).

Čas věnovaný exploraci byl vlivem MA poznamenán v rámci porovnání efektu této drogy mezi pohlavími [F (2,42)=0,279] (Obr. 7 C). Samci po expozici MA strávili touto aktivitou méně času než samice stejné skupiny ( $p<0,05$ ). Stejně tomu tak je i u obou kontrolních skupin C i S, kdy samice touto aktivitou strávily více času než samci ( $p<0,001$ ). Frekvence výskytu explorační aktivity byla ovlivněna expozicí u obou pohlaví [F (2,42)=1,053] (Obr. 7 D). Hlavní efekt pohlaví se projevil u samic, které vykonávaly tento typ chování častěji než samci, bez ohledu na expozici [F (1,42)=14,807;  $p<0,001$ ]. S ohledem na expozici, u samců vedlo ke snížení vykonávání této aktivity i samotné podávání fyziologického roztoku u skupiny S oproti skupině C ( $p<0,05$ ). Stejně tak pokud budeme srovnávat skupinu ovlivněnou MA a C, kde také u experimentální skupiny došlo ke snížení frekvence ( $p<0,001$ ). Samice ve skupině MA vykazovaly snížení oproti oběma kontrolním skupinám, skupina C ( $p<0,01$ ) a skupina S ( $p<0,05$ ). Pokud budeme porovnávat efekt MA mezi pohlavími, je patrné, že samci ve skupině MA měli sníženou frekvenci exploračního chování než samice téže skupiny ( $p<0,05$ ). U skupin S vedlo podávání fyziologického roztoku ke stejným výsledkům, tedy že samci vykonávali exploraci méně než samice ( $p<0,01$ ).

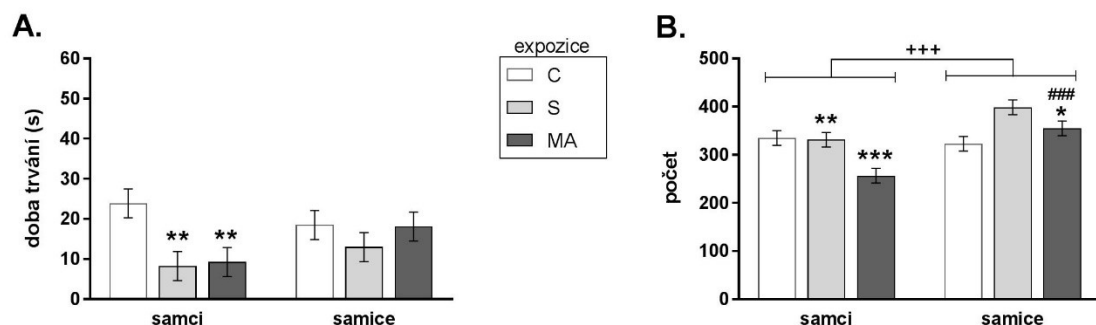
Z obrázku 8 A je patrné, že expozice drogy (MA) a fyziologického roztoku (S) během vývoje vedla u samců ke snížení času stráveného lokomocí v průběhu všech tří intervalů v porovnání s absolutní kontrolou (C) [F (4,84)=0,281;  $p<0,01$ ]. Statistická analýza interakcí odhalila, že u všech skupin (C, S, MA) u obou pohlaví se s postupem záznamu zvyšovala frekvence lokomoční aktivity [F (4,84)=3,629;  $p<0,001$ ] (Obr. 8 B). Negativní účinek aplikace MA na výskyt této aktivity byl nalezen jak u samců ve všech 5-minutových intervalech ( $p<0,001$ ), tak u samic v intervalu 5-10 min a 10-15 min ( $p<0,01$ ). U samců byl navíc tento negativní dosah expozice drogy výraznější v porovnání se samicemi ve všech úsecích záznamu ( $p<0,01$ ) (Obr. 8 B).

Z analýzy dat jednotlivých intervalů explorační aktivity zvířat je patrné, že během měření se čas strávený explorací zvyšoval ve všech měřených intervalech u všech skupin, C,

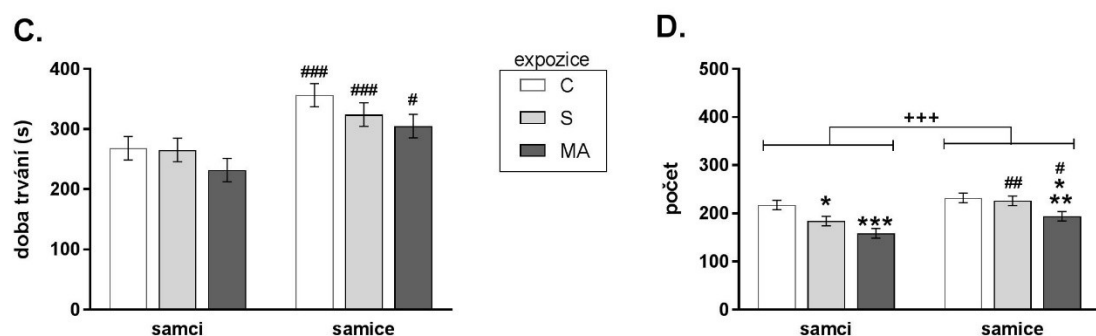
S i MA u obou pohlaví [ $F(4,84)=1,927$ ;  $p<0,001$ ] (obr. 8 C). V intervalu 10-15 min došlo ke snížení času věnovaného této aktivitě u samců skupiny MA oproti skupině C ( $p<0,001$ ). U samic exponovaných MA došlo ke snížení času stráveného explorací oproti skupině C v intervalu 5-10 min ( $p<0,05$ ) i 10-15 min ( $p<0,001$ ). Expozice MA vedla u samců ke snížení času stráveného touto aktivitou ve všech třech měřených intervalech oproti samicím stejné expozice ( $p<0,01$ ). Z porovnání kontrolních skupin C je zřejmé, že doba explorace u samic je ve všech časových úsecích delší než u samců ( $p<0,001$ ). Na obrázku 8 D poté vidíme, že došlo k navýšení frekvence této nesociální aktivity u samců i samic všech skupin (C, S, MA) během všech třech intervalů [ $F(4,84)=1,511$ ;  $p<0,001$ ]. V úsecích 5-10 min a 10-15 min můžeme u obou pohlaví pozorovat snížení frekvence u skupin MA oproti skupinám C a S ( $p<0,001$ ). V průběhu celého měření byla frekvence explorace nižší u samců MA a S oproti samicím stejných skupin ( $p<0,01$ ).

## Celková aktivita během 15 minut

### Lokomoce

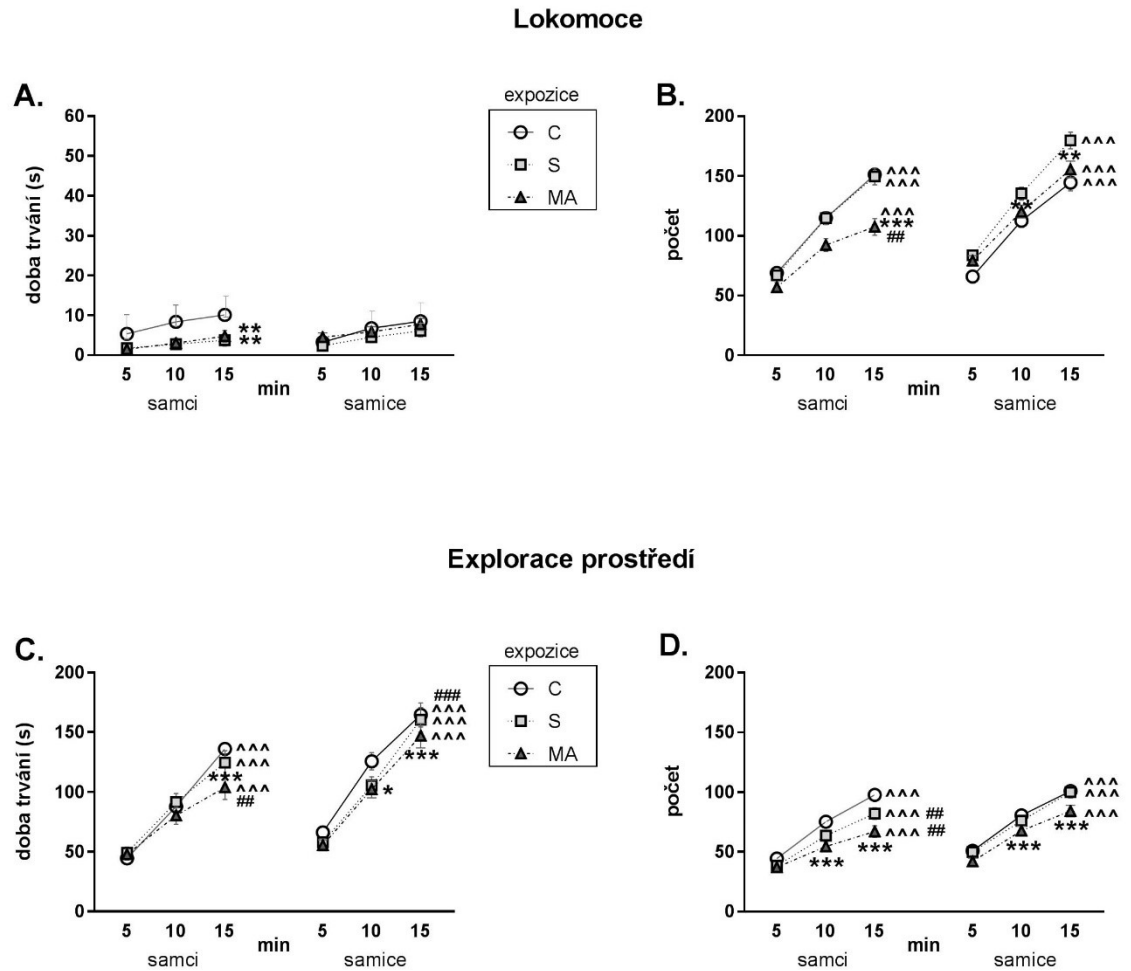


### Explorace prostředí



**Obr. 7: Vliv expozice a pohlaví na nesociální aktivity u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. A. Lokomoce – doba trvání.** \*\* $p < 0,01$  samci S a MA vs. samci C. **B. Lokomoce – frekvence.** \*\*\* $p < 0,001$  samci MA vs. samci C; \*\* $p < 0,01$  samci MA vs. samci S; \* $p < 0,05$  samice MA vs. samice S; ### $p < 0,001$  samci MA vs. samice MA; +++ $p < 0,001$  samci vs. samice. **C. Explorace prostředí – doba trvání.** # $p < 0,05$  samci MA vs. samice MA; ### $p < 0,001$  samci C a S vs. samice C a S. **D. Explorace prostředí – frekvence.** +++ $p < 0,001$  samci vs. samice. \* $p < 0,05$  samci S vs. samci C; \*\*\* $p < 0,001$  samci MA vs. samci C; \*\* $p < 0,01$  samice MA vs. samice C; \* $p < 0,05$  samice MA vs. samice S; # $p < 0,05$  samci MA vs. samice MA; ### $p < 0,001$  samci S vs. samice S.

## Aktivita ve třech 5-minutových intervalech



**Obr. 8: Vliv expozice a pohlaví na průběh nesociální aktivity u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. A. Lokomoce – doba trvání.** \*\*p<0,01 samci C vs. samci S a MA. **B. Lokomoce – frekvence.** ^^^p<0,001 zvýšení frekvence aktivity v čase u samic i samců C, S, MA; \*\*\*p<0,001 samci MA vs. samci C a S ve všech intervalech; \*\*p<0,01 samice MA vs. samice S 5-10 min a 10-15 min; ##p<0,01 samci MA vs. samice MA ve všech intervalech. **C. Explorace prostředí – doba trvání.** ^^^p<0,001 zvýšení frekvence aktivity v čase u samic i samců C, S, MA; \*\*\*p<0,001 samci a samice MA vs. samci a samice C 10-15 min; \*p<0,05 samice MA vs. samice C 5-10 min; ##p<0,01 samci MA vs. samice MA; ###p<0,001 samci C vs. samice C. **D. Explorace prostředí – frekvence.** ^^^p<0,001 zvýšení frekvence aktivity v čase u samic i samců C, S, MA; \*\*\*p<0,001 samci a samice MA vs. samci a samice C a S 5-10 min a 10-15 min; ##p<0,01 samci MA a S vs. samice MA a S.

## 11. Diskuse

Cílem této preklinické experimentální práce bylo zjistit vliv aplikace MA v kritické periodě vývoje (GD 18 – PD 10) na sociální hru laboratorního potkana. Hřebíčková a Šlamberová (2018) zjistily, že kritickou vývojovou periodou pro účinky MA je pro sociální chování GD 12-22 a PD 1-11, což představují období pozdní gravidity a raného neonatálního života u laboratorního potkana. V této studii byl zjištěn nižší sociální kontakt mezi dvěma neznámými potkany po expozici 5 mg/ml/kg 1-krát denně, právě během tohoto období. V této době totiž dochází k vývoji monoaminergních zakončení neuronů, které jsou citlivé na MA, proto během expozice může docházet k negativnímu ovlivnění jejich vývoje. Jiné klinické experimenty dokázaly souvislost mezi užíváním MA matkami během gestace a následným poškozením čelního laloku plodu, což může v dospělosti vést ke snížení schopností sociálních interakcí (Jablonski et al. 2015; Robinson & Kolb, 2004; Behnke et al, 2013). K samotnému ovlivnění plodu dochází prostřednictvím krve matky a poté skrze jejich mateřské mléko během laktace. Je známo, že MA je látkou dobře rozpustnou v tucích, snadno překračuje nejen hematoencefalickou a placentární bariéru, ale během kojení se vylučuje také do mateřského mléka, což může mít za následek potenciální zhoršení postnatálního vývoje plodu (Steiner, Villen, Hallberg & Rane, 1984; Hřebíčková, Malinová-Ševčíková, Macúchová, Nohejlová & Šlamberová, 2014; Šlamberová, Pometlová & Charousová, 2006). Proto se v práci zabýváme jak prenatálním, tak i postnatálním obdobím.

Do zkoumaných parametrů patřily sociální aktivity spojené s hraním (rotace partnera, dorzální kontakt, pronásledování partnera), aktivity spojené se sociálním zkoumáním (očíhávání v oblasti genitálií) a také nesociální chování (explorace, lokomoce). Nesociální chování je nedílnou součástí chování jakožto celku. Bylo sledováno především z důvodu porozumění sexuálního dimorfismu. Obě pohlaví vykonávají zpravidla některé pro ně typické aktivity častěji, například samci rotaci a samice nesociální průzkumné chování (Pak et al., 2007). Z tohoto důvodu byly do studie zahrnuta i lokomoce a explorační aktivita, pro objasnění, jak bude MA působit na přirozené vzorce chování. Po analýze dat jsme následně byli schopni také rozlišit, zda nedošlo ke snížení sociální hry právě potlačením zvýšení motorické aktivity.

Prvním cílem naší práce bylo objasnit, jak expozice MA během senzitivní periody (GD 18 až PD 10) ovlivňuje sociální hru a explorační aktivitu samců a samic v období adolescence (PD 30). Vlivem prenatální a raně postnatální expozice MA se věnoval již Homer et al. (2008), kterého zajímali především účinky na serotonergní a dopaminergní neurotransmiterový systém. Poukázal na to, že změny v sociálních aktivitách potkanů mohou být spojeny se změnami v CNS způsobenými expozicí MA. Lidé MA používají pro jeho údajné účinky usnadňující navazování interakcí a společenské kontakty. Nicméně dle Homera et al. (2008) je již známo, že MA sociální chování narušuje. Tento fakt potvrdilo již několik studií, které v rámci svých výsledků došly k závěru, že akutní expozice MA snižuje



zájem o sociální kontakt (Hřebíčková et al., 2017; Šlamberová et al., 2015; Šlamberová, Mikulecká, Pometlová, Schutová, Hrubá & Deykuk, 2010; Davidson a kol. 2001). Tímto fenoménem se zabývala také Ševčíková et al. (2020). V rámci jejího výzkumu byla adolescentním potkanům aplikována akutní dávka MA 1 mg/kg 45 minut před testem sociální hry. Tato studie zjistila, že MA vedl ke snížení všech zkoumaných sociálních aktivit. Hřebíčková et al. (2017) poté potvrdila, že k ovlivnění sociálního chování v dospělosti dochází i vlivem prenatální a neonatální expozice MA podávané během pozdní gestace a časně laktace u potkanů. Naše studie došla ke stejným výsledkům, kdy analýzou námi získaných dat bylo zjištěno, že MA aplikovaný v kritickém období vývoje během GD 18 až PD 10 v dávce 5 mg/ml/kg 1 x denně určité typy sociální hry ovlivňuje. Naše výsledky ukazují, že u aktivit spojených s hraním došlo ke snížení doby i frekvence. Ovlivněna byla jak celková rotace partnera, tak dorzální kontakt a pronásledování partnera. Samotný průběh záznamu ve třech 5-minutových intervalech jednotlivých aktivit byl expozicí MA rovněž ovlivněn. Z výsledků je zřejmé, že došlo ke snížení všech zkoumaných aspektů sociální hry během jednotlivých intervalů. Všechny typy sociálního chování jako takového jsou tedy ovlivněny MA, který zapříčiňuje změny v dopaminergním systému. Tento systém však zprostředkovává i nesociální aktivity, kam patří průzkumové chování. Naše výsledky ukázali, že expozice MA vedla ke snížení času a frekvence strávené lokomoční aktivitou a explorací nejenom v rámci celkové aktivity, ale také ve všech jednotlivých úsecích měření. Výsledek naší práce koreluje s domněnkou o působení MA na CNS. Z předešlých studií totiž víme, že MA je neurotoxický a ovlivňuje poškození buněk v CNS, ve vyšších dávkách vede až k apoptóze těchto buněk. Tyto poškození vlivem MA jsou způsobena autooxidací dopaminu a serotoninu. Z nich totiž vlivem MA vzniká 6-hydroxydopamin a 5,6-dihydroxytryptamin. Vlivem nestability 6-hydroxydopaminu vznikají peroxidy vodíku, které posléze podmiňují vznik volných radikálů. Tyto volné radikály zapříčiňují narušení funkčnosti buněk v CNS (Cruickshank & Dyer 2009). Tímto způsobem mohli být ovlivněny neurony v CNS u našich experimentálních zvířat již během jejich prenatálního vývoje, a to tedy v postnatálním životě vedlo k poklesu sociálních aktivit.

Druhým cílem naší práce bylo objasnit mezipohlavní rozdíly v sociální hře laboratorních potkanů v průběhu adolescence. Rozdíly v sociálním chování mezi samci a samicemi byli již dokázány v předchozích studiích. Tyto rozdíly jsou s největší pravděpodobností způsobeny tím, že samci a samice mají na základě rozdílných neuroanatomíí mozku odlišné neuronové sítě zajišťující sociální chování. Tyto sítě se vyvíjejí v druhé polovině gravidity až do třetího týdne postnatálního života. Pohlavní dimorfismus v CNS je také ovlivněn steroidními pohlavními hormony, které zasahují jak do neuroanatomie mozku, tak ve výsledku ovlivňují behaviorální vzorce chování (Pak et al., 2007; Patisaul, Scordaleks, Young & Rissman, 2003). Shansky a Woolley (2016) ve své práci zjistili, že pro vývoj CNS je důležité působení testosteronu a estradiolu, kdy konkrétně od GD 18 až do porodu vrcholí účinek testosteronu na dozrávání CNS. V tomto období dochází v mozku samců ke změně testosteronu na estradiol vlivem enzymu aromatázy.

Estradiol poté potlačuje apoptózu neuronů v určitých částech CNS. Naše studie prokázala, že mezipohlavní rozdíly, způsobené uvedenými mechanismy jsou přítomny ve většině zkoumaných parametrů. Rotaci prováděli častěji a delší dobu samci. Dorzální kontakt a pronásledování naopak samice. Analýza aktivity očichávání genitální oblasti byla v našem výzkumu vyhodnocena bez signifikantních výsledků, i když by se dalo předpokládat, že rozdíl v aktivitě mezi samci a samicemi by měl být přítomen, jak ukazují jiné studie. V mozku samců jsou objemnější části CNS: mediální amygdala a mediální proeoptická oblast. Tyto struktury odpovídají za zpracování čichových stimulů (Pak et al, 2007; Patisaul et al, 2003). V mozku samic je ale zase více dendritických trnů ve ventrální tegmentální oblasti, prefrontálním kortexu a *nucleus accumbens*, což by mohlo ve výsledku vést k delšímu času stráveného genitálním očicháváním a pronásledováním u samic (Weissman & Caldecott-Hazard, 1995), což jsme v naší práci částečně potvrdili.

Vzhledem k době expozice MA během vývoje plodu zohledňujeme v naší studii nejenom samotný účinek MA či pohlavních hormonů na sociální hru, ale také jejich vzájemnou interakci. V účincích MA, který zprostředkovává uvolňování noradrenalinu, dopaminu a serotoninu, jsou pohlavní rozdíly vzniklé hlavně odlišnou citlivostí dopaminergního systému. Dle Vanderschuren et al. (1997) jsou určité sociální aktivity častější u samců než u samic. Samice sociální aktivity vyhledávaly celkově méně a častěji hru ukončovaly. Páry samců celkově vykazovali větší míru sociálního chování než páry samic. Tato práce zjistila, že je to způsobeno především androgeny. Samice, kterým byl podán v časném postnatálním období testosteron, poté vykazovaly více sociálního chování než samice bez expozice tohoto hormonu. Heidari-Rarani et al. (2013) v rámci zkoumání účinků MA na hypofyzární gonadální osu a spermatogenezi u dospělých samců potkanů zjistili, že sekrece testosteronu je vlivem působení MA snížena. U samců v naší studii tedy mohlo dojít ke snížení sociálního chování právě tímto fenoménem. Dále Dluzen (2000) se věnoval protektivním účinkům estrogeneru na dopaminergní systém. Zjistil, že tento hormon může snižovat dopad různých neurotoxinů, mezi které patří i MA, na dopaminergní systém. Tyto efekty je možné aplikovat na naše výsledky, kdy vlivem expozice MA během vývoje CNS došlo u samic v porovnání se samci stejné expozice k nižší redukci času stráveného danou aktivitou. Aktivity spojené s hravým chováním byly tedy celkově častější a trvaly delší dobu u samic než u samců, což mohlo zapříčinit snížení sekrece testosteronu vlivem účinku MA, který u samců podněcuje sociální chování. Samice vzhledem k vyšší koncentraci estrogeneru byly na expozici MA méně citlivé. Co se týče nesociálních aktivit, lokomoce a explorační, jsou samice přirozeně aktivnější v průzkumném chování než samci (Pak et al., 2003), tudíž vlivem MA byl tento rozdíl dále podpořen. U samic se dá předpokládat vyšší sekrece dopaminu. Nesociálním chováním strávily více času samice než samci, a to u všech zkoumaných skupin. Expozice MA vedla u obou skupin ke snížení těchto aktivit, ale i v tomto případě byly aktivnější samice. Ve srovnání působení MA na pohlaví samice vykonávaly nesociální aktivity častěji než samci stejné expozice. Expozice MA vedla ke snížení aktivity ve všech jednotlivých úsecích měření oproti kontrolním skupinám.

V experimentu byla kromě absolutní kontroly C, jež byla bez jakékoliv expozice, použita i kontrolní skupina, které se podával fyziologický roztok 1 ml/kg. Tato skupina sloužila k eliminaci zkreslení výsledků způsobených samotným vpichem, který může u zvířat působit jako stresující faktor. V odborné literatuře je již popsán vztah mezi náladou matky během těhotenství a budoucím chováním dítěte. Na základě dostupných důkazů se zdá pravděpodobné, že stres či úzkost vzniklá u matek během těhotenství ovlivňuje fetální vývoj hypothalamo-hypofyzární osy, limbického systému a prefrontální kůry (Van den Bergh, Mulder, Mennes & Glover, 2005). Mateřský stres může ovlivnit plod přímo, transportem neuropeptidů a nepřímo prostřednictvím změn v toku krve matky a plodu (Dipietro, Hilton, Hawkins, Costigan & Pressman, 2002). O'Connor et al. (2002) ve své studii specifikovali, že nejkritičtějším obdobím působení prenatalního stresu je poslední trimestr, který v rámci naší studie odpovídá aplikační periodě. Z našich výsledků je patrné, že do určité míry byla sociální hra doopravdy ovlivněna i samotnou injekční aplikací. Dá se tedy předpokládat, že k ovlivnění došlo vzniklým stresem vyvolaným injekcí u matky, který mohl nepřímo zasáhnout do vývoje plodu. Chování bylo však ovlivněno méně než u expozice MA, ke které se přidal i neurotoxický účinek exponované látky. Přesto se jedná o poznatek, který by bylo zajímavé dále zkoumat, protože stále zůstává mnoho otázek o tom, jak přesně funguje prenatalní vývoj u lidí a jakým konkrétním způsobem souvisí načasování, druh, intenzita a trvání vnějších faktorů, do kterých patří i stres, se změnami v neurobehaviorálním chování jak u experimentálních zvířat, tak i u lidí.

Chyby ve výsledcích byly eliminovány použitím ustálené metodiky. Jedná se o vícekrát otestovanou a v praxi běžně používanou metodiku, a i samotná sociální hra je striktně charakteristický test pro zkoumání zvolených forem chování. Pro zajištění správných výsledků jsme do pokusu zařadili vždy dvě mláďata z jednoho hnízda, jednoho samce a jednu samici. Tím byla eliminována chybovost v rámci aplikace, rozdílné péče o zvířata během pokusu a eliminovali jsme i mateřskou péči, která může být odlišná u jednotlivých matek bez ohledu na expozici. Navíc se o zvířata během expozic, i v rámci celého průběhu pokusu, starala vždy jedna osoba. Tím se eliminoval i stres z nových vůní, které zvířata na lidech cítí. Stejná osoba zabezpečila i handling během manipulace se zvířaty. Důsledkem všech těchto opatření by měla být zajištěna minimální chybovost, nicméně pro přesnější výsledky by bylo vhodné v navazujících studiích využít program Observer test od firmy Noldus (Holandsko), který vyhodnocuje automaticky na základě videozáznamu bez potřeby vizuální kontroly člověkem. Vyhodnocování v rámci programu ODLog totiž může být vzhledem k manuálnímu zaznamenávání člověkem zatíženo chybou. Observer test námi nebyl použit, protože v čase pokusu ho nebylo možné od firmy zakoupit. Pro přesnější výsledky, jež by nebyly nijak ovlivněny lidským faktorem by bylo v další práci vhodné použít již tento nový software.

## 12. Závěr

- Expozice MA vedla u sociálního chování spojeného s hraním ke snížení času i frekvence v rámci dorzálního kontaktu a rotace partnera. Čas byl snížen i v rámci dalšího parametru sociální hry, v pronásledování partnera.
- Pronásledování a dorzální kontakt byl celkově prováděn více samicemi, rotace spíše samci.
- Samice exponované MA vyhledávaly sociální hru častěji než samci stejné expozice.
- Aktivita spojená se sociálním zkoumáním, očíhávání oblasti genitálií, nebyly expozicí MA ovlivněny.
- Expozice MA vedla ke snížení celkové horizontální i vertikální motorické aktivity zvířat.
- Exploraci a lokomoci se celkově věnovaly více samice než samci.
- Samice exponované MA prováděly nesociální aktivity častěji a déle než samci stejné expozice.

Užívání MA těhotnými ženami je, a dá se i předpokládat že dále bude, problém celosvětového charakteru. Je více než jasné, že je tímto způsobem života ohrožena nejen matka, ale právě i vývoj jejího potomka. U dětí dochází k neurobehaviorálním deficitům, které jsme v rámci animálního modelu potvrdily touto studií.

V rámci této práce byla získána data důležitá pro prohloubení znalostí účinku MA během kritické periody a případné změny vzniklé účinkem prenatálního testosteronu způsobené expozicí touto drogou. Tím můžeme více odhalit, jak návykové látky zvýrazňují mezipohlavní rozdíly v chování. Našimi výsledky přispějeme ke zkvalitnění života dětí, které byly prenatálně vystaveny účinkům MA a matkám uživatelkám poskytneme více informací o rizicích pramenících z jejich životního stylu.

### 13. Seznam použité literatury

Doležal, M. (2013). *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha, Česko: Karolinum.

Kalina, K et al. (2015). *Klinická adiktologie*. Praha, Česko: Grada Publishing.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction & Europol (2010). *Metamfetamin (pervitin): Situace v EU a její globální kontext*. Praha: Centrum Adiktologie a sdružení SCAN.

McCusker J., Bigelow C., Vickers -Lahi M., Spotts D., Garfield F & Frost R. (1997). Planned duration of residential drug abuse treatment: efficacy versus effectiveness. *Addiction*, 92(1), 1467-78. doi: 10.1111/j.1360-0443.1997.tb02868.x

Tomášková, A. (2017). *Nastavení genové exprese v dospělém mozku pokusného potkana po prenatalním vystavení metamfetaminu*. (Diplomová práce). Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/195605/>.

Sanchez-Ramones, J. (2004). Figure 1 Chemical Structures of  $\beta$  -Phenylethylamine. *ResearchGate*. [vid. 2020-02-28]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-b-phenylethylamine-numbered-amphetamine-and-methamphetamine\\_fig1\\_281506491](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-b-phenylethylamine-numbered-amphetamine-and-methamphetamine_fig1_281506491)

Senft, V. (2009). Metamfetamin. *Ministerstvo Zdravotnictví ČR*. [vid. 2019-12-26]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/SFADL.htm>

Zábranský, T. (2007). Methamphetamine in the Czech Republic. *Journal of Drug Issues*, 37 (1), 115–180. doi: 10.1177/002204260703700108

ACMD (2005). *Methylamphetamine review', a report by the Advisory Council on the Misuse of Drugs*, [vid. 2019-11-09]. Dostupné z: <https://www.gov.uk/government/publications/advisory-council-on-the-misuse-of-drugs-methylamphetamine-review-2005-executive-summary>

Case, P. (2005). *The history of methamphetamine: An epidemic in context*, First National Conference on Methamphetamine, HIV and Hepatitis, The Harm Reduction Project, Salt Lake City, USA.

Griffiths P., Mravcik V., Lopez D., Klempova, D. (2008). Quite a lot of smoke but very limited fire: The use of methamphetamine in Europe. *Drug and Alcohol Review*, 27 (3), 236–42. doi: 10.1080/09595230801932588

- Nechanská, B. (2019). Drogová úmrť a úmrť pod vlivem drog v roce 2018. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [vid. 2019-11-09]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/drogova-umrti-umrti-pod-vlivem-drog-v-roce-2018>.
- Dubertret C., Gorwood P., Ades J., Feingold J., Schwartz JC., Sokoloff P. Meta - analysis of DRD3 gene and schizophrenia: Ethnic heterogeneity and 80 significant association in caucasians. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 81(4), 318-322.
- Mysliviček J., Pretl M., Hrabovská A. (2009). *Základy neurovědy*. Praha, Česko: TRITON.
- Kalina, K. (2003). *Drogy a drogové závislosti*. Praha, Česko: Úřad vlády České republiky.
- Lampert S. M., Kaye A. D., Urman R. D & Manchikanti L. (2015). *Substance Abuse: Inpatient and Outpatient Management for Every Clinician*. New York, USA: Springer.
- Numachi N., Ohara A., Yamashita M., Fukushima S., Kobayashi K., Hata H., ... Sora I. (2007). Methamphetamine - induced hyperthermia and legal toxicity: Role of the dopamine and serotonin transporters. *Elsevier – European Journal of pharmacology*, 572, 120-128. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.06.022
- Cho A. K., Melega W. P., Kuczenski R. & Segal D. S. (2001). Relevance of pharmacokinetic parameters in animal models of methamphetamine abuse. *Synapse*, 39(2), 161–166. doi: 10.1002/1098-2396(200102)39
- Yui K. & Miura T. (1996). Behavioral Responses Induced by Repeated Treatment with Methamphetamine Alone and in Combination with Scopolamine in Rats. *Neuropsychobiology*. 33, 21–27. doi: 10.1159/000119244
- Kish S. J., Tong J., Hornykiewicz O., Rajput A., Chang L. J., ... & Furukawa Y. (2008). Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain*, 131(1), 120-31. doi: 10.1093/brain/awm239
- Rothman R. B., Buamann M. H., Derchs C. M., Romero D. V., Rice K. C., Carroll F. I. & Partilla J. S. (2001). Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse*, 39(1), 32-41. doi: 10.1002/1098-2396(20010101)39:1<32::AID-SYN5>3.0.CO;2-3
- Belin D. & Everitt B. J. (2008). Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron*, 57(3), 432-41. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.019
- Rice D. & Barone S. JR. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*, 108(3), 511-33. doi: 10.1289/ehp.00108s3511

- Jablonski S. A., Williams M. T. & Vorhees C. V. (2015). Neurobehavioral Effects from Developmental Methamphetamine Exposure. *Curr Top Behav Neurosci.* 29, 183-230. doi: 10.1007/7854\_2015\_405.
- Jablonski S. A., Graham D. L., Vorhees C. V. & Williams M. T (2016). Effects of Neonatal Methamphetamine and Stress on Brain Monoamines and Corticosterone in Prewanling Rats. *Neurotox Res*, 31(2), 269-82. doi: 10.1007/s12640-016-9680-y
- Ricaurte G. A., Seiden L. S. & Schuster C. R. (1984). Further Evidence That Amphetamines Produce Long-Lasting Dopamine Neurochemical Deficits by Destroying Dopamine Nerve-Fibers. *Brain Research*, 303(2), 359-364.
- Kato R. & Yamazoe Y. (1992). Sex-Specific Cytochrome P450 as a Cause of Sex-Related and Species-Related Differences in Drug Toxicity. *Toxicology Letters*, 64(5). 661-667.
- Roth M. E. & Carroll M. E. (2004). Sex differences in the acquisition of IV methamphetamine self-administration and subsequent maintenance under a progressive ratio schedule in rats. *Psychopharmacology*, 172(4), 443-449. doi: 10.1007/s00213-015-4183-8
- Kučerová-Rudá J., Amchová P., Babinská Z., Dušek L., Micale V. & Šulcová A. (2015). Sex differences in the reinstatement of methamphetamine seeking after forced abstinence in Sprague-Dawley rats. *front Psychiatry*, 6(91). doi: 10.3389/fpsyt.2015.00091
- Rambousek L., Kačer P., Syslová K., Bumba J., Bubeníková-Valešová V. & Šlamberová R. (2014). Sex differences in methamphetamine pharmacokinetics in adult rats and its transfer to pups through the placental membrane and breast milk. *Drug and Alcohol Dependence*, 139, 138-44. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.03.023
- Kučerová J., Vršková D. & Šulcová A. (2009). Impact of repeated methamphetamine pretreatment on intravenous self-administration of the drug in males and estrogenized or non-estrogenized ovariectomized female rats. *Neuro Endocrinol Lett*, 30(5), 663-70.
- White T. L., Justice A. J. H. & De Wit H. (2002). Differential subjective effects of D-amphetamine by gender, hormone levels and menstrual cycle phase. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73 (4), 729-741. doi: 10.1016/S0091-3057(02)00818-3
- Marwick, C. (2000). NIDA seeking data on effect of fetal exposure to methamphetamine. *JAMA*, 283(17), 2225-26. doi: 10.1001/jama.283.17.2225-JMN0503-2-1
- Zapata L. B., Hillis S. D., Marchbanks P. A., Curtis K. & Lowry R. (2008). Methamphetamine use is independently associated with recent risky sexual behaviors and adolescent pregnancy. *J Sch Health*, 78(12), 641-8, doi: 10.1111/j.1746-1561.2008.00360.x.
- Steinberg J. K., Grella C. E., Boudov M. R., Kerndt P. R. & Kadrnka C. M. (2011). Methamphetamine use and high-risk sexual behaviors among incarcerated female adolescents with a diagnosed STD. *J Urban Health*, 88(2), 352-64, doi: 10.1007/s11524-011-9557-6.
- Kocherlakota, P. (2014). Neonatal abstinence syndrome. *Pediatrics*, 134(2), 547-561, doi: 10.1542/peds.2013-3524

- Williams M. T., Blankenmeyer T. L., Schaefer T. L., Brown C. A., Gudelsky G. A. & Vorhees C. V. (2003a). Long-term effects of neonatal methamphetamine exposure in rats on spatial learning in the Barnes maze and on cliff avoidance, corticosterone release, and neurotoxicity in adulthood. *Brain Res Dev Brain Res* 147(1-2): 163-75.
- Williams M. T., Moran M. S. & Vorhees C. V. (2003b) Refining the critical period for methamphetamine-induced spatial deficits in the Morris water maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 168, 329-38. doi: 10.1016/j.devbrainres.2003.11.001
- Della Grotta S., Lagasse L. L., Arria A. M., Derauf C., Grant P., Smith L. M., ... Lester B. M. (2010). Patterns of methamphetamine use during pregnancy: results from the Infant Development, Environment, and Lifestyle (IDEAL) Study. *Matern Child Health J*, 14(4), 519-27. doi: 10.1007/s10995-009-0491-0
- Robinson T. E. & Becker J. B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res*, 396(2), 157-98. doi: 10.1016/0165-0173(86)90002-0
- Datell, B. J. (1990). Substance abuse in pregnancy. *Semin Perinatol*, 14(2), 179-87.
- Konkol, R. J. (1994). Is There a Cocaine Baby Syndrome. *Journal of Child Neurology*, 9(3), 225-226.
- Konkol R. J., Murphey L. J., Ferriero D. M., Dempsey D. A. & Olsen G. D. (1994). Cocaine Metabolites in the Neonate - Potential for Toxicity. *Journal of Child Neurology*, 9(3): 242-248. doi: 10.1177/088307389400900305
- Tronick E. Z. & Beeghly M. (1999). Prenatal cocaine exposure, child development, and the compromising effects of cumulative risk. *Clinics in Perinatology*, 26(1). doi: 10.1016/S0095-5108(18)30076-9
- Wouldes T. A., Roberts A. B., Pryor J. E., Bagnall C. & Gunn T. R. (2004). The effect of methadone treatment on the quantity and quality of human fetal movement. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(1), 23-34. doi: 10.1016/S0095-5108(18)30076-9
- Dixon S. D. & Oro A. (1987). Cocaine and Amphetamine Exposure in Neonates - Perinatal Consequences. *Pediatric Research*, 21, 359.
- Chang L., Smith L. M., Lopresti C., Yonekura M. L., Kuo J., Walot I. & Ernst T. (2004). Smaller subcortical volumes and cognitive deficits in children with prenatal methamphetamine exposure. *Psychiatry Research-Neuroimaging*, 132(2), 95-106. doi: 10.1016/j.psychresns.2004.06.004
- Hansen R. L., Struthers J. M. & Gospe S. M. (1993). Visual-Evoked Potentials and Visual Processing in Stimulant Drug-Exposed Infants. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 35(9), 798-805. doi: 10.1111/j.1469-8749.1993.tb11731.x
- Cernerud L., Eriksson M., Jonsson B., Steneroth G. & Zetterstrom R. (1996). Amphetamine addiction during pregnancy: 14-year follow-up of growth and school performance. *Acta paediatrica*, 85(2), 204-208. doi: 10.1111/j.1651-2227.1996.tb13993.x



- Nguyen D., Smith L. M., LaGasse L. L., Derauf C., Grant P., Shah R. & Della Grotta S. (2010). Intrauterine growth of infants exposed to prenatal methamphetamine: results from the infant development, environment, and lifestyle study. *The Journal of pediatrics*, 157(2), 337-39. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.04.024
- Vavříková B., Binder T., Živný J. & Vítková I. (2001). Placental and umbilical cord changes in drug-addicted women. *Česká gynekol.*, 66(5), 345-49.
- Martin J. C., Martin D. C., Radow B. & Sigman G. (1976). Growth, development and activity in rat offspring following maternal drug exposure. *Exp Aging Res*, 2(3), 235-51. doi: 10.1080/03610737608257179
- Acuff-smith K., George M., Lorens S. & Vorhees C. (1996). Preliminary evidence for methamphetamine-induced behavioral and ocular effects in rat offspring following exposure during early organogenesis. *Psychopharmacology (Berl)*, 109(3), 255-63. doi: 10.1007/bf02245871
- Bubeníková-Valešová V., Kačer P., Syslová K., Rambousek L., Janovský M., Schutová B., ... Šlamberová R. (2009). Prenatal methamphetamine exposure affects the mesolimbic dopaminergic system and behavior in adult offspring. *Int J Dev Neurosci*, 27(6), 525-30. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.06.012
- Hrubá L., Schutová B., Šlamberová R. & Pometlová M. (2008). Does cross-fostering modify the impairing effect of methamphetamine on postnatal development of rat pups? *Prague Med Rep*, 109(1), 50-61.
- Malinová-Ševčíková M., Hřebíčková I., Macúchová E., Nová E., Pometlová M. & Šlamberová R. (2014). Differences in maternal behavior and development of their pups depend on the time of methamphetamine exposure during gestation period. *Physiol Res*, 63(4), 559-72.
- Šlamberová R., Charousová P. & Pometlová M. (2005). Maternal behavior is impaired by methamphetamine administered during pre-mating, gestation and lactation. *Reproductive Toxicology*, 20(1), 103-10. doi: 10.1016/j.reprotox.2004.11.010
- Weissman A. D. & Caldecott-Hazard S. (1995). Developmental neurotoxicity to methamphetamines. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22, 372-74. doi: 10.1111/j.1440-1681.1995.tb02022.x
- Vorhees C. V. & Pu C. (1995). Ontogeny of methamphetamine-induced neurotoxicity in the rat model. *NIDA Res Monogr*, 158, 149-71.
- Fox, W. M. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav*, 13(2-3), 234-41. doi: 10.1016/0003-3472(65)90041-2
- Bartu A., Dusci L. J. & Ilett K. F. (2009). Transfer of methylamphetamine and amphetamine into breast milk following recreational use of methylamphetamine. *Br J Clin Pharmacol*, 67(4), 455-59. doi: 10.1111/j.1365-2125.2009.03366.x

Ilett K. F., Hackett L. P., Kristensen J. H. & Kohan R. (2007). Transfer of dexamphetamine into breast milk during treatment for attention deficit hyperactivity disorder. *Br J Clin Pharmacol*, 63(3), 371-75. doi: 10.1111/j.1365-2125.2006.02767.x

Bridges R. S. & Grimm C. T. (1982). Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. *Science*, 218(4568), 166–68. doi: 10.1126/science.7123227

Fraňková, S. (1977). Drug-Induced Changes in Maternal-Behavior of Rats. *Psychopharmacology*, 53(1), 83-87.

Cui C., Sakata-Haga H., Ohta K., Nishida M., Yashiki M., Sawada K. & Fukui Y. (2006). Histological brain alterations following prenatal methamphetamine exposure in rats. *Congenit Anom*, 46(4), 180-87. doi: 10.1111/j.1741-4520.2006.00126.x

Chomchai C., Chomchai S. & Kitsommart R. (2016). Transfer of Methamphetamine (MA) into Breast Milk and Urine of Postpartum Women who Smoked MA Tablets during Pregnancy: Implications for Initiation of Breastfeeding. *J Hum Lact*, 32(2). 333-39. doi: 10.1177/0890334415610080

Hrubá L., Schutová B. & Šlamberová R. (2012). Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following prenatal and postnatal methamphetamine exposure in adult rats. *Physiol Behav*, 105(2), 364-70. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.08.016

Vorhees C. V, Skelton M. R., Grace C. E., Schaefer T. L., Graham D. L., Braun A. A. & Williams M. T. (2009). Effects of (+)-methamphetamine on path integration and spatial learning, but not locomotor activity or acoustic startle, align with the stress hyporesponsive period in rats. *Int J Dev Neurosci*, 27(3), 289-98. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.12.003

Vorhees C. V, Ahrens K. G., Acuff-Smith K. D., Schilling M. A. & Fisher J. E. (1994). Methamphetamine exposure during early postnatal development in rats: I. Acoustic startle augmentation and spatial learning deficits. *Psychopharmacology*, 114, 392-401. doi: 10.1007/BF02249328

Vorhees C. V., Reed T. M., Skelton M. R. & Williams M. T. (2004). Exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on postnatal days 11-20 induces reference but not working memory deficits in the Morris water maze in rats: implications of prior learning. *Int J Dev Neurosci*, 22(5-6), 247-59. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.06.003

Williams M. T., Moran M. S. & Vorhees C. V. (2004). Behavioral and growth effects induced by low dose methamphetamine administration during the neonatal period in rats. *Int J Dev Neurosci*, 22(5-6), 273-83. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.04.003

Crawford C. A., Williams M. T., Newman E. R., Mcdougall S. A. & Vorhees C. V. (2003). Methamphetamine exposure during the preweanling period causes prolonged changes in dorsal striatal protein kinase A activity, dopamine D2-like binding sites, and dopamine content. *Synapse*, 48(3), 131-7. doi: 0.1002/syn.10197

Graham D. L., Amos-Kroohs R. M., Braun A. A., Grace C. E., Schaefer T. L., Skelton M. R. ... Vorhees C. V. (2013). Neonatal +-methamphetamine exposure in rats alters adult locomotor responses to dopamine D1 and D2 agonists and to a glutamate NMDA

receptor antagonist, but not to serotonin agonists. *The international Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(2), 377-91. doi: 10.1017/S1461145712000144

Nicholls J. G., Martin A. R., Wallace B. G. & Fuchs P. A. (2013). *Od neuronu k mozku*. Praha, Česko: Academia.

Semple B. D., Blomgren K, Gimlin K, Ferrero D. M. & Noble-Haeusslein L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress Neurobiology*, 106-107(6-107), 1-16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001

Ulijaszek S., Johnston F. E. & Preece M. (1998). *The Cambridge encyclopedia of human growth and development*. Cambridge, Anglie: University Cambridge Press.

Sadler, T. W. (2011). *Langmanova lékařská embryologie*. Praha, Česko: Grada.

Tau G. Z. & Peterson B. S. (2010). Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 147-68. doi: 10.1038/npp.2009.115

Thompson B. L., Levitt P. & Stanwood G. D. (2009). Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. *Nat Rev Neurosci*, 10(4), 303-12. doi: 10.1038/nrn2598

Goulding M. D., Lumsden A. & Gruss P. (1993). Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development*, 117, 1001-16. doi: 10.1016/0168-9525(93)90082-S

Le Douarin, N. M. (1981). Plasticity in the development of the peripheral nervous system. *Ciba Found Symp.*, 83, 19-50. doi: 10.1002/9780470720653.ch2

Herlenius E. & Lagercrantz H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*, 190(1), 8-21. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.03.027

Olson L. & Seiger A. (1972). Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Z. Anat. Entwicklungsgesch*, 137(3), 301-16. doi: 10.1007/bf00519099

Sundstrom E., Kolare S., Souverbie F., Samuelsson E. B., Pschera H., Lunell N. O. & Seiger A. (1993). Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Developmental Brain Research*, 75(1), 1-12. doi: 10.1016/0165-3806(93)90059-J

Diamond, A. (1996). Evidence for the importance of dopamine for prefrontal cortex functions early in life. *Philosophical Transaction of The Royal Society Biological Sciences*, 351(1346), 1483-93. doi: 10.1098/rstb.1996.0134

Goldman-Rakic, P. S. (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14(3), 477-85. doi: 10.1016/0896-6273(95)90304-6

- Hoyer D., Hannon J. P., & Martin G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(4), 533-54. doi: 10.1016/S0091-3057(01)00746-8
- Clancy B., Finlay B. L., Darlington R. B. & Anand K. J. (2007) Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*, 28(5), 931-7. doi: 10.1016/j.neuro.2007.01.014
- Workman A. D., Charvet C. J., Clancy B., Darlington R. B. & Finlay B. L. (2013). Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci*, 33(17), 7368-83. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013
- Dobbing J. & Sands J. (1973): Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child*, 48(10), 757-67. doi: 10.1136/adc.48.10.757
- Gaspar P., Cases O. & Maroteaux L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(12), 1002-12. doi: 10.1038/nrn1256
- Greenough W. T., Black J. E. & Wallace C. S. (1987). Experience and brain development. *Child Development*, 58(3), 539-59. doi: 10.2307/1130197
- Lenroot R. K. & Giedd J. N. (2006). Brain Development in Children and Adolescents: Insights from Anatomical Magnetic Resonance Imaging. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 30(6), 718–29. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.06.001
- Baron-Cohen S., Lutchmaya S. & Knickmeyer R. (2004). *Prenatal testosterone in mind: amniotic fluid studies*. Londýn, Anglie: A Bradford book.
- Goldstein J. M., Seidman L. J., Horton N. J., Makris N. K., Kenned D. N., Caviness Jr., ... & Tsuang M. T. (2001). Normal sexual dimorphism of the adult human brain assessed by in vivo magnetic resonance imaging. *Cerebral Cortex*, 11(6), 490–497. doi: 10.1093/cercor/11.6.490
- Yamamoto, D. (2007). *Genetics of sexual differentiation and sexually dimorphic behaviors*. San Diego, USA: Academic Press,
- Giedd J. N., Castellanos F. X., Rajapakse J., Vaituzis A. C. & Rapoport J. L. (1997). Sexual dimorphism of the developing human brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 21(8), 1185–1201. doi: 0.1016/S0278-5846(97)00158-9
- De Vries G. J. & A. Boyle P. A. (1998). Double duty for sex differences in the brain. *Behavioural Brain Research*, 92(2), 205–13. doi: 10.1016/S0166-4328(97)00192-7
- Lenroot R. K., Gogtay N., Greenstein D. K., Molloy W. E., Wallace G. L., Clasen L., ... Giedd J. N. (2007). Sexual dimorphism of brain developmental trajectories during childhood and adolescence. *NeuroImage*, 36(4), 1065–73. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.03.053
- Becker J. B., Berkley K. J., Geary N., Hampson E., Herman J. P. & Young E., A. (2008). *Sex differences in the brain: from genes to behavior*. New York, USA: Oxford University Press, Inc.

- Schulz K. M. & Sisk C. L. (2006). Pubertal hormones, the adolescent brain, and the maturation of social behaviors: lessons from the Syrian hamster. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254-255, 120–26. doi: 10.1016/j.mce.2006.04.025
- Sisk C. L. & Foster D. L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nat. Neurosci*, 7, 1040–47. (cit. Lenroot et al. 2007).
- McEwen B. S., Davis P. G., Parsons B. & Pfaff, D. W. (1979). *A. Rev. Neurosci.* 2, 65–112.
- Goy R. W. & McEwen B. S. (1980). *Sexual Differentiation of the Brain*. Cambridge, Massachusetts: MIT Press.
- Stockard, C. R. (1920-1921): *Amer. J. Anat.*, 28, 115-266.
- Křeček, J. (1973). O kritických vývojových periodách. *Čs. Fysiol.*, 22, 505-20.
- King, J. A. (1958). *Psychol Bull*, 55, 46-54.
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), 3-18. doi: doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00005-8
- Zheng D. & Purves D. (1995): Effects of increased neural activity on brain growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(6), 1802-6. doi: 10.1073/pnas.92.6.1802
- Hřebíčková, I. (2018). *Určení kritické vývojové periody pro účinky metamfetaminu na chování laboratorního potkana v dospělosti*. (Dizertační práce). Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav normální, patologické a klinické fyziologie.
- Hřebíčková I. & Šlamberová R. (2017). Sex differences in the strategies of spatial learning in prenatally-exposed rats treated with various drugs in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 327, 83-93. doi: 10.1016/j.bbr.2017.03.041
- Ševčíková M., Hřebíčková I., Macúchová E. & Šlamberová R. (2017). The influence of methamphetamine on maternal behavior and development of the pups during the neonatal period. *International Journal of Development Neuroscience*, 59, 37-46. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.03.005
- Koob G. F. & Zimmer A. (2012). Neurobiology of Psychiatric Disorders. *Handbook of Clinical Neurology*, 106.
- Poole T. & Fish J. (2009). An investigation of individual, age and sexual differences in the play of *Rattus norvegicus* (Mammalia: Rodentia). *Journal of Zoology*, 179(2), 249–59. doi: 10.1111/j.1469-7998.1976.tb02294.x
- Vanderschuren D., Louk J. M. J., Raymond J. M., Niesink & Van Pee M. (1997). The Neurobiology of Social Play Behavior in Rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(3), 309–26. doi: 10.1016/S0149-7634(96)00020-6
- Robinson T. E. & Kolb B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*, 47(1), 33-46. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.06.025

Behnke M., Smith V. C., Committee on substance A, Committee on F and Newborn. (2013). Prenatal substance abuse: short- and long-term effects on the exposed fetus. *Pediatrics* 131(3), 1009-24. doi: 10.1542/peds.2012-3931

Steiner E., Villen T., Hallberg M. & Rane A. (1984). Amphetamine secretion in breast milk. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 27, 123-4.

Hřebíčková I., Malinová-Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R. (2015) Exposure to methamphetamine during 1st and 2nd half of prenatal period and its consequences on cognition after long-term application in adulthood. *Physiological Research*, 63(4), 535-545.

Šlamberová R., Pometlová M. & Charousová P. (2006). Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(1), 82-8. doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.06.006

Pak T. R., Chung W. C., Hinds L. R. & Handa R. J. (2007). Estrogen receptor-beta mediates dihydrotestosterone-induced stimulation of the arginine vasopressin promoter in neuronal cells. *Endocrinology*, 148(7), 3371-82. doi: 10.1210/en.2007-0086

Homer B. D., Solomon T. M., Moeller R. W., Mascia A., Deraleau L. & Halkitis P. N. (2008). Methamphetamine abuse and impairment of social functioning: a review of the underlying neurophysiological causes and behavioral implications. *Psychological Bulletin*, 134(2), 301-10. doi: 10.1037/0033-2909.134.2.301

Šlamberová R., Mikulecká A., Macúchová E., Hřebíčková I., Ševčíková M., Nohejlová K. & Pometlová M. (2015). Effects of psychostimulants on social interaction in adult male rats. *Behavioural Pharmacology*, 26, 776-85. doi: 10.1097/FBP.0000000000000148

Šlamberová R., Mikulecká A., Pometlová M., Schutová B., Hrubá L. & Deykun K. (2010). The effect of methamphetamine on social interaction of adult male rats. *Behavioural Brain Research*, 214(2), 423-7. doi: 10.1016/j.bbr.2010.06.019

Davidson C., Gow A. J., Lee T. H. & Ellinwood E. H. (2001) Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Research Reviews*, 36(1), 1-22. doi: 10.1016/S0165-0173(01)00054-6

Ševčíková M., Petříková I. & Šlamberová R. (2020). Methamphetamine Exposure during the First, but Not the Second Half of Prenatal Development, Affects Social Play Behavior. *Physiological Research*.

Cruickshank C. C. & Dyer K. R. (2009). A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*, 104(7), 1085-99. doi: 10.1111/j.1360-0443.2009.02564.x

Shansky R. M. & Woolley C. S. (2016). Considering Sex as a Biological Variable Will Be Valuable for Neuroscience Research. *The Journal of Neuroscience*, 36(47), 11817-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI

Heidari-Rarani M., Noori A. & Ghodousi A. (2013). Effects of Methamphetamine on Pituitary Gonadal Axis and Spermatogenesis in Mature Male Rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(12), 37-42.

Dluzen, D. E. 2000. Neuroprotective Effects of Estrogen upon the Nigrostriatal Dopaminergic System. *Journal of Neurocytology*, 29(5-6), 387–99. doi: 10.1023/a:1007117424491

Van den Bergh, Bea R. H., Eduard J. H., Mulder, Maarten M. & Glover V. (2005). Antenatal Maternal Anxiety and Stress and the Neurobehavioural Development of the Fetus and Child: Links and Possible Mechanisms. A Review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(2), 237–58. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.10.007 ·

DiPietro, Janet A., Sterling C. H., Hawkins M., Costigan K. A. & Pressman E. K. (2002). Maternal stress and affect influence fetal neurobehavioral development. *Developmental Psychology*, 38(5), 659–68. doi: 10.1037/0012-1649.38.5.659

O'Connor, Thomas G., Heron J., Golding J., Beveridge M. & Glover V. (2002). Maternal Antenatal Anxiety and Children's Behavioural/Emotional Problems at 4 Years: Report from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *The British Journal of Psychiatry*, 180(6), 502–8. doi: 10.1192/bjp.180.6.502

## 14. Seznam zkratk

MA – metamfetamin

MDMA – extáze

CNS – centrální nervová soustava

GD – gestační den

PD – postnatální den

♂ – samec

♀ – samice



## 15. Seznam tabulek

Tab. 1: Počet zvířat zařazených do pokusu .....	27
---	----

## 16. Seznam obrázků

<b>Obr. 1:</b> Srovnání struktur katecholaminů (dopamin a adrenalin) s metamfetaminem .....	11
<b>Obr. 2:</b> Aplikační perioda během gestace a časně laktace .....	27
<b>Obr. 3:</b> Vliv expozice a pohlaví na aktivity spojené s hravým chováním u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. A. Dorzální kontakt – doba trvání. B. Dorzální kontakt – frekvence. C. Kompletní rotace partnera – doba trvání. D. Kompletní rotace partnera – frekvence. E. Pronásledování partnera – doba trvání. F. Pronásledování partnera – frekvence. ....	32
<b>Obr. 4:</b> Vliv expozice a pohlaví na průběh aktivity spojené s hravým chováním u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. A. Dorzální kontakt – doba trvání. B. Dorzální kontakt – frekvence. C. Kompletní rotace partnera – doba trvání. D. Kompletní rotace partnera – frekvence. E. Pronásledování partnera – doba trvání. F. Pronásledování partnera – frekvence. ....	33
<b>Obr. 5:</b> Vliv expozice a pohlaví na aktivity spojené se sociálním zkoumáním u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. A. Vzájemné očíhávání v oblasti genitálií – doba trvání. B. Vzájemné očíhávání v oblasti genitálií – frekvence. ....	34
<b>Obr. 6:</b> Vliv expozice a pohlaví na průběh aktivity spojené se sociálním zkoumáním u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. A. Vzájemné očíhávání v oblasti genitálií – doba trvání. B. Vzájemné očíhávání v oblasti genitálií – frekvence. ....	35
<b>Obr. 7:</b> Vliv expozice a pohlaví na nesociální aktivity u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. A. Lokomoce – doba trvání. B. Lokomoce – frekvence. C. Explorace prostředí – doba trvání. D. Explorace prostředí – frekvence. ....	38
<b>Obr. 8:</b> Vliv expozice a pohlaví na průběh nesociální aktivity u samců a samic ovlivněných v období GD 18 až PD 10. A. Lokomoce – doba trvání. B. Lokomoce – frekvence. C. Explorace prostředí – doba trvání. D. Explorace prostředí – frekvence. ....	39

[illegible]